Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med.,Dr.rer.nat.Ernst Schütte

DIE Mg^{2+}-AUFNAHME VON TIERISCHEN ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ebel, Hans
aus Berlin

1965

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien
Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med.,Dr.rer.nat.Ernst Schütte

DIE Mg^{2+}-AUFNAHME VON TIERISCHEN ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ebel, Hans
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med.Adalbert L o e s c h k e
Referent: Professor Dr.med.,Dr.rer.nat.Ernst S c h ü t t
Korreferat: Professor Dr.med.Egon W e r n e r

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 1. Juni 1965

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Methode	
	1. Wahl des Versuchsobjektes	12
	2. Wahl der Versuchsbedingungen	14
	3. Zellbehandlung	15
	4. Bestimmung der EZF in gepackten Zellen	18
	5. Bestimmung der Haemolyse	20
	6. Mg^{2+}-Bestimmung	20
	7. Berechnung der Mg^{2+}-Aufnahme	22
	8. Berechnung der Fehler	23
C	Ergebnisse	
	1. Zeitlicher Verlauf der Mg^{2+}-Aufnahme	24
	2. Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen der EZF	26
	3. Mg^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit vom extrazellulären Na^{+}:K^{+}Verhältnis	29
	4. Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen der EZF	31
	5. Mg^{2+}-Aufnahme bei Anwesenheit von Glycin oder Indolacetat in der EZF	33
	6. Abhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme von der Glukoseaufnahme	35
	7. Mg^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit von verschiedenen PO_4^{3-}-Konzentrationen der EZF	37
	8. Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen	39
	9. Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von Glykolysegiften	40
	10. Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß des Atmungsgiftes Cyanid	42

Seite

11. Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von Entkopplern 44

12. Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von g-Strophanthin 47

D Diskussion 50

E Zusammenfassung 58

F Literaturverzeichnis 61

Abkürzungen

Nachstehend sind die im Text nicht erklärten Abkürzungen aufgeführt:

ATP = Adenosintriphosphat

ADP = Adenosindiphosphat

AMP = Adenosinmonophosphat

DNP = 2.4 DNP = 2.4 Dinitrophenol

DNS = Desoxyribonucleinsäure

EDTA = ÄDTE = Äthylendiamintetraessigsäure

EZF = extrazelluläre Flüssigkeit

EZR = extrazellulärer Raum

IZF = intrazelluläre Flüssigkeit

IZR = intrazellulärer Raum

$\mu = 1/2 \sum c_i \cdot z_i^2$; es sind μ = Ionenstärke

c_i = Konzentration der Ionenart i (M/l)

z_i = Ladung der Ionenart i

P_a = anorganisches Phosphat

RNS = Ribonucleinsäure

Einleitung

Der erwachsene menschliche Körper mit dem Normalgewicht von 70 kg bei einem Gewichtsanteil von 20 % Fett enthält 21 - 28 Mg, das sind 1.720 - 2.300 mVal(1). Der Na- und K-Gehalt des Körpers liegt in mVal ausgedrückt jeweils etwa doppelt so hoch (Tab. 1). Das Mg kann mit Na, K und Ca zur Gruppe der Kationen gerechnet werden, die in relativ großen Mengen im Körper vorkommen.

	Na	K	Ca	Mg
mVal	4.502	3.730	48.962	1.970

Tab. 1 Kationengehalt in einem Körper von 70 kg mit einem Gewichtsanteil von 20 % Fett. Na, K, Ca nach (2)

Die Verteilung des Mg im Organismus geht aus der Tabelle 2 hervor. Ähnlich wie K ist das Mg im EZR nur in relativ geringen Mengen vorhanden. Der Hauptteil des Mg ist im Knochen lokalisiert. Wenn man vom Knochen absieht, ist das Mg ein überwiegend intrazelluläres Erdalkalimetall.

	Gesamt	Knochen	IZR	EZR
mVal	1.736	910	785	41
%	100	53	45	2

Tab. 2 Mg-Verteilung in einem Körper von 70 kg mit einem Gewichtsanteil von 20 % Fett. Nach (3)

Auch innerhalb der Zelle ist das Mg ungleichmäßig verteilt. In der Rattenleber kommt Mg vor allem im Nucleus, in den Mitochondrien und den Mikrosomen vor. Nur ein geringer Anteil findet sich im Überstehenden (4,5). Hinsichtlich der prozentualen Verteilung unterscheiden sich die Angaben (Tab. 3). Während nach Griswold und Pace der größte Teil des Mg in den Mikrosomen lokalisiert ist (4), fanden Thiers und Vallee die größte Mg-Menge in den Nuclei (5). Die Angaben über das Mg-Vorkommen in den Mitochondrien und im Überstehenden stimmen etwa überein.

Fraktion	Ref. 4	Ref. 5
Nucleus	13.4 ± 4	47.8
Mitochondrien	21.8 ± 3.5	17.4
Mikrosomen	48.0 ± 4.5	13.7
Bindegewebe	--	2.0
Überstehendes	12.8 ± 3.4	19.2

Tab. 3 Intrazelluläre Mg-Verteilung in der Rattenleber in % des Gesamtgehaltes

Für die Zustandsform des Mg im IZR ist seine Fähigkeit bestimmend, mit Nucleotiden und Proteinen Komplexe zu bilden. Die Komplexbildungskonstante ist definiert als:

$$K_{MgX} = \frac{(MgX)}{(MG^{2+}) \cdot (X^{2-})}$$

Die Analogie mit dem Dissoziationsgleichgewicht einer schwachen Säure oder Base liegt auf der Hand:

$$K_{HA} = \frac{(HA)}{(H^{+}) \cdot (A^{-})}$$

Man kann daher das Gemisch des freien Komplexbildners mit dem Mg-Komplex als einen Metallpuffer betrachten (6) und in Analogie zum p_H einen p_{Metall}, speziell p_{Mg} definieren als $p_{Mg} = - \log(Mg^{2+})$.

Die starke Komplexbildungsfähigkeit des Mg mit Nucleotiden zeigt sich zum Beispiel darin, daß 64 % des nucleären Mg fest mit DNS, RNS und Mononucleotiden verbunden sind. Der Rest des Mg ist wahrscheinlich ionisiert, weil er extrahierbar ist. Das an DNS und RNS gebundene Mg wird erst nach ihrer enzymatischen Spaltung frei (7). Bei den Mg-Nucleotid-Chelaten wird die Beteiligung der Phosphatgruppen an der Ringbildung angenommen (7), wobei die Sauerstoffatome für die Koordinationsbindung herangezogen werden sollen (8).

Die Mg-Komplexbildungskonstante von ATP haben verschiedene Autoren bestimmt (Tab. 4). Über ihre Größe besteht jedoch keine Übereinstimmung. Dementsprechend müssen die Berechnungen der Mg^{2+}-Aktivität im IZR verschieden ausfallen. Die genaue Kenntnis der intrazellulären Mg^{2+}-Aktivität ist aber notwendig, wenn man die Bedeutung des Mg für den Zellstoffwechsel aufklären möchte.

Autor	Ref	Methode	t (°C)	μ	$K_{MgATP^{2-}}(M^{-1})$
Nanninga	9	Kationenaustausch	23	0.1	2.000
Smith	10	pH-Titration	25	0.2	2.970
Martell	8	pH-Titration	20	0.1	10.000
Walaas	11	Kationenaustausch	23	0.1	11.000
Melchior	12	Einfluß des $MgCl_2$ auf den pH der Nucleotidlösung	25	0.2	20.000
Nanninga	13	Kationenaustausch	25	0.1	20.900
		pH-Titration			26.700
Burton	14	8-Hydroxyquinolin	25	0.1	38.000

Tab. 4 Die Komplexbildungskonstante $K_{MgATP^{2-}}$ bei verschiedenen Autoren

Die Komplexbildungskonstanten verschiedener Adenosinmononucleotide sind von Martell und Schwarzenbach bestimmt worden (8,15). Dabei stellte sich heraus, daß die Komplexbildung eines Adenosinphosphates mit der Verlängerung der Phosphatkette größer wird (Tab. 5).

Tab. 5 Die Komplexbildungskonstante der Adenosinphosphate mit Mg^{2+} bei $t = 20^{o}C$ und $\mu = 0.1$

Nucleotid	log K_{MgX}
AMP	1.69
ADP	3.11
ATP	4.00

Das Gemisch von Mg^{2+} und Adenosinphosphaten bildet einen Metallpuffer. Die Verteilung von AMP, ADP und ATP bedingt den p_{Mg}. Berechnungen zeigen, daß mit steigendem Phosphatpolymerisierungsgrad die Mg^{2+}-Konzentration sinkt. Demnach kann die Mg^{2+}-Konzentration innerhalb der Zelle durch Phosphorylierungsreaktionen variiert und reguliert werden (6).

Für eine Vielzahl von Enzymen ist eine Abhängigkeit der Aktivität von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration festgestellt worden. Dies kann der Tabelle 6 entnommen werden. Die Beziehung zwischen der Aktivität der Hexokinase und der Mg^{2+}-Konzentration ist von Raaflaub und Leupin (16) untersucht worden. Sie fanden, daß die Aktivität zwischen p_{Mg} 4 - 6 stark abfällt. Dies bedeutet, daß die Geschwindigkeit der

Hexokinasereaktion durch die nachfolgende Phosphatpolymerisierung gedrosselt wird, weil damit eine Zunahme des p_{Mg} verbunden ist (16). Auch die Phosphohexokinasereaktion kann durch Verschiebungen des p_{Mg} reguliert werden (6).

Enzym	Ref.
Peptidasen	
Leucinaminopeptidase	17-22
Carboxypeptidase	23-25
Carboxylasen	
der Hefe	26
des Herzens	27
Phosphatasen	
der Prostata	28
der Hefe	29
alkal. Phosphatase	30-32
Transferasen	
Phosphoglucomutase	33-35
Hexokinase	
des Tieres	36
der Hefe	16
Fructokinase	37,38
Pyruvatkinase	39
Myokinase	40
ATP-ase	41,42
Transphosphorylase:	
Kreatinin	43,44
Arginin	45,46

Die Frage nach dem Mechanismus der Enzymaktivierung durch Mg^{2+} ist nicht gelöst. Nach einer Hypothese von Martell kann das Enzym nur dann aktiviert werden, wenn es in bestimmten Gruppen ein Metallion komplex gebunden hat. Daneben soll es aber Gruppen geben, die für die spezifische enzymatische Reaktion freibleiben müssen (47). Werden diese infolge eines Überschusses von Metallionen besetzt, so ist die Enzymreaktion gehemmt (48,49).

Nach einer anderen Hypothese soll ein Mg-ATP-Komplex als das eigentliche Enzymsubstrat gebildet werden (50). Die hemmende Wirkung der Ca^{2+}-Ionen, z. B. bei der Hexokinasereaktion, wird durch die Bildung eines Ca-ATP-Komplexes erklärt, der mit dem Mg-ATP-Komplex um das Enzym konkurrieren soll (50). Die durch Mg^{2+} bewirkte Aktivierung der Kinasereaktion wird auch von Larsson und Malmström (51) und Hers (58) auf die Bildung eines Mg-ATP-Komplexes zurückgeführt.

Eine andere Funktion des Mg in der Zelle besteht wahrscheinlich in dem Erhalten von Strukturen. Dies ist eingehend an Mitochondrien studiert worden. Durch zahlreiche Reagentien können die Struktur und der Stoffwechsel der Mitochondrien geändert werden, u. a. durch Thyroxin. Das von dieser Verbindung verursachte Schwellen der Mitochondrien und die Entkopplung der oxydativen

Phosphorylierung können durch Mg^{2+}-Gabe rückgängig gemacht werden (52). Da das Thyroxin die Mitochondrienschwellung bereits bei einer Konzentration hervorruft, die unter der für die Entkopplung liegt, scheint es, daß das Hormon primär die Struktur und erst sekundär den Stoffwechsel verändert. Mg wirkt demnach primär strukturerhaltend auf die Mitochondrien (53). Hierfür sprechen auch andere Ergebnisse. Zum Beispiel kann der schwellungshemmende Effekt von Mg gegenüber Thyroxin nicht durch den Zusatz von 2.4-DNP oder Cyanid beeinträchtigt werden, d.h. die Mg-Wirkung ist von der oxydativen Phosphorylierung unabhängig (54). Da bei bestimmten Isolierungsmethoden der Mitochondrien auch ohne Mg^{2+}-Zusatz maximale oxydative Phosphorylierung erzielt werden kann, wird angenommen, daß Mg an die intakte Mitochondrienstruktur gebunden ist. Wahrscheinlich werden die Mg^{2+}-Gaben erst dadurch notwendig, daß die Mitochondrienstruktur im Verlauf der Isolierung geschädigt wurde (55).

Die Bedeutung des Mg für die Zellstruktur wurde ebenfalls an E. coli gezeigt. Bei Züchtung in Mg^{2+}-freien Medien verlieren sie ihre Mikrosomen und die Fähigkeit zur Proteinsynthese. Zugabe von Mg^{2+} macht diese Ausfälle rückgängig (56).

Wegen der bedeutenden Rolle des intrazellulären Mg ist es wichtig zu wissen, ob seine Konzentration durch den Einstrom bzw. Ausstrom von Mg^{2+} verändert werden kann. Diese Frage blieb lange unklar. In vitro war zwar eine Mg^{2+}-Aufnahme von Menschenerythrozyten beobachtet worden, jedoch waren dazu auf das 50fache des physiologischen Wertes erhöhte extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentrationen notwendig (57).

Das Problem ließ sich schließlich durch Versuche mit Isotopen lösen. Mit Mg^{28} konnte gezeigt werden, daß in vivo ein Mg-Austausch zwischen EZR und IZR möglich ist. Nach Injektion von Mg^{28} fand man nämlich eine Ansammlung der Aktivität im Gewebe (58).

Die Geschwindigkeit des Mg-Austausches ist bei den einzelnen Organen der Ratte verschieden groß. Es läßt sich eine Gruppe schnell austauschender Organe von einer langsamer austauschenden Organgruppe unterscheiden. Zu der schnellen Gruppe gehören Leber, Herz und Niere (58,59). Bei ihnen ist der Austausch nach drei Stunden abgeschlossen. Zu der langsam austauschenden Gruppe gehören Gehirn, Testes, Skelettmuskel und Erythrozyten (58,59). Die Organe der langsam austauschenden Gruppen enthalten zwei mit verschiedener Geschwindigkeit austauschende Mg-Fraktionen. Bei der einen ist nach 14 - 35 Stunden der Austausch voll-

ständig, bei der anderen nach 90 Stunden noch nicht abgeschlossen (58). Es wird angenommen, daß die am langsamsten austauschende Fraktion vom gebundenen Mg des IZR gestellt wird (58). Die in vivo gewonnenen Ergebnisse sind bei den Erythrozyten von Menschen, Katze und Ratten in vitro reproduzierbar, denn in beiden Fällen waren die Mg-Austauschgeschwindigkeiten dieser Zellen gleich (59).

Es ist unsicher, ob die mit Mg^{28} gemessene Mg-Permeation mit oder gegen den Konzentrationsgradienten erfolgt, denn die genaue intrazelluläre Mg^{2+}-Aktivität ist nicht bekannt. Nanninga berechnete für den Froschmuskel unter Berücksichtigung der Komplexbildung mit ATP, Kreatininphosphat und Myosin eine freie Mg^{2+}-Konzentration von 3,37 mM/l (60). Gegen diesen Wert läßt sich einwenden, daß er von der Mg-ATP-Komplexbildungskonstanten abhängig ist, über deren Größe unterschiedliche Angaben vorliegen (8-14). Außerdem liegt der Rechnung die Annahme zugrunde, daß das Mg innerhalb der Zelle überall in gleichen Konzentrationen vorkommt. Wie jedoch am Beispiel der Leber gezeigt wurde, ist dies nicht der Fall (4,5).

Im Frosch-Serum ist der Mg-Gehalt ca. 1 mM/l (61). Nach Abzug des eiweißgebundenen Anteils, der beim Menschen mit 35 - 45 % angegeben wird (62,63), beträgt die

extravasale Mg^{2+}-Konzentration ca. 0,6 mM/l. Die am Froschmuskel in vitro aus einer 2 mM/l Mg^{2+}-Lösung erfolgende Mg^{28}-Aufnahme (64) müßte, wenn man die von Nanninga berechnete Menge des freien Mg^{2+} anerkennt, gegen den Konzentrationsgradienten gerichtet sein. Dies würde einen aktiven Mg^{2+}-Transport bedeuten, wobei der aktive Transport die Aufnahme einer Substanz gegen den Konzentrationsgradienten sein soll (65). Nach einer umfassenderen Definition ist der Transport auch in Richtung des Konzentrationsgradienten dann als aktiv zu bezeichnen, wenn er stoffwechselabhängig ist (66).

Problemdarstellung:

Im Vorangehenden wurde die Wichtigkeit des Mg für die Enzymaktivierung und Zellstruktur beschrieben und gezeigt, daß Mg^{2+} durch die Zellmembran permeiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedingungen kennenzulernen, unter denen Mg^{2+} in die Zelle gelangt. Es wurde die Abhängigkeit der Mg^{2+}-Permeation vom extrazellulären Milieu und von den energieliefernden zellulären Reaktionen untersucht.

Methode

Wahl des Versuchsobjektes:

Für zellphysiologische Untersuchungen werden verschiedene Systeme verwendet, z. B. Gewebsschnitte und Zellsuspensionen. Bei dem Gebrauch von Gewebsschnitten müssen die Beziehungen zwischen Schnittdicke, Diffusion und Zellstoffwechsel als Fehlerquelle in Kauf genommen werden (67,68). Außerdem können Schnitte während der Inkubation Eiweiß an das Medium verlieren (68), das durch Komplexbildung mit Mg^{2+} die Mg^{2+}-Aktivität der EZF erniedrigt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auf den Gebrauch von Gewebsschnitten zugunsten der Zellsuspensionen verzichtet.

Isolierte Leber- oder Nierenzellen können gewonnen werden, indem man die betreffenden Organe schonend homogenisiert oder durch Gaze preßt. Um die Ausbeute zu erhöhen, durchströmten einige Untersucher Lebern vor der mechanischen Zerkleinerung mit Ca^{2+}-Komplexbildnern, wie Zitrat oder EDTA. Auf diese Weise erhielt man licht- und elektronenmikroskopisch intakte Zellen (69,70), deren Membran lediglich kleine Pseudopodienausstülpungen aufwies (70). Diese Zellen zeigten aber keine endogene Atmung (69,71) und anaerobe Glykolyse mehr (72). Die Stoffwechseländerungen wurden durch

das Übertreten der Aldolase und Laktatdehydrogenase in die EZF erklärt (73). Außerdem sollen die Na- und K-Gradienten abgesunken sein (72,74).

Eine andere Möglichkeit, Zellen zu isolieren, besteht in der Behandlung der zerkleinerten Gewebe mit Trypsin. Man erhielt aber neben intakten Zellen auch Mitochondrien (75). Das Trypsin soll nämlich Proteine von der Zellmembran ablösen (72). Der Stoffwechsel der so gewonnenen Zellen war allerdings gegenüber Gewebsschnitten nicht verändert (75).

Für die Untersuchung von Permeabilitätsfragen scheiden diese stoffwechselgestörten und membrangeschädigten Zellen aus. Außerdem ist die Zellausbeute für die Zwecke der vorliegenden Arbeit zu gering.

Es wurden die leicht intakt gewinnbaren Erythrozyten und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (ELD) verwendet, deren Stoffwechsel genau bekannt ist. Die Zellen wurden nach den Gesichtspunkten verschiedenen Stoffwechsels ausgesucht: 1. atmende kernhaltige Hühnererythrozyten, 2. atmende und glykolysierende Ascites-Zellen und 3. glykolysierende menschliche Erythrozyten. Die Vogelerythrozyten wurden als Modell für die kernhaltigen Somazellen betrachtet.

Wahl der Versuchsbedingungen:

Für die Untersuchung der Mg^{2+}-Aufnahme stand das oft benutzte Mg^{28} (58,59,76,77) nicht zur Verfügung. Infolgedessen konnten keine Versuche im "steady state" der Mg^{2+}-Permeation gemacht werden. Um eine Mg^{2+}-Aufnahme zu messen, mußten die Versuchsbedingungen so gewählt werden, daß das stationäre Gleichgewicht der Mg^{2+}-Permeation gestört wird. Dies kann einmal durch Erhöhen der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration erreicht werden. Nach diesem Prinzip verfuhren Tufts und Greenberg bei Menschenerythrozyten (57) und Conway und Beary bei Hefezellen (78). Zum anderen konnten in vitro an menschlichen Erythrozyten (79) und an Vogelerythrozyten (80) Verschiebungen der Na- und K-Verteilung nach einer Kälteinkubation festgestellt werden. Durch Reinkubation bei 37° C wurden die normalen Na- und K-Gradienten wieder hergestellt.

Aus Vorversuchen geht aber hervor, daß in Mg^{2+}-freier Inkubationslösung suspendierte Vogelerythrozyten im Verlauf einer viertägigen Alterung bei 4° C keine meßbaren Mg^{2+}-Mengen abgeben. Hingegen konnte eine Mg^{2+}-Aufnahme durch Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration erreicht werden.

Zellbehandlung:

Die menschlichen Erythrozyten wurden durch Punktieren der Armvenen von gesunden Erwachsenen gewonnen. Entsprechend wurde das Vogelblut aus den Flügelvenen von Hähnen abgelassen. Während der Abnahme wurde das Blut im Gegensatz zu Ascites heparinisiert. Die Ascites-Zellen wurden aus dem freipräparierten Abdomen enthaupteter weißer Mäuse abgesaugt, denen 7 bis 10 Tage zuvor 0,2 ml Ascites intraperitoneal injiziert worden war.

Durch vierminütiges Zentrifugieren bei 4.000 g wurden die Erythrozyten vom Serum getrennt. Anschließend wurden das Serum und die auf der Oberfläche des Sediments befindlichen Leukozyten abgesaugt. Nur wenn der Einfluß verschiedener Kationenkonzentrationen auf den Mg^{2+}-Transport untersucht werden sollte, wurde das Erythrozytensediment 2 Minuten lang bei 4.000 g gewaschen. Hierzu diente eine Lösung, deren Zusammensetzung mit Ausnahme von Glukose und Mg^{2+} dem Inkubationsmilieu entsprach. In allen anderen Fällen wurde auf das Waschen verzichtet. Es wird nämlich berichtet, daß K^{42} enthaltende Hundeerythrozyten pro Zellwäsche in einer isotonen K^{+}-haltigen Salzlösung 1,82 % Aktivität mehr verlieren als die ungewaschenen Zellen im gleichen Zeitraum (81).

Der Ascites wurde 2 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die im Ascites befindlichen Erythrozyten oberhalb der bereits sedimentierten Tumorzellen diffus im Serum verteilt. Nach dem Absaugen des Serums blieben jedoch noch Erythrozyten im Ascites-Sediment zurück. Um sie zu entfernen, wurden die Zellen 1 - 3 mal gewaschen.

Die nach Entfernen des Überstehenden verbleibenden Zellen wurden in Warburg-Gefäßen suspendiert. Dabei wurden die Erythrozyten aus dem dichtgepackten Sediment in die Warburg-Gefäße pipettiert, in denen sich bereits das Suspensionsmedium befand. Die durch das Zentrifugieren entstandene Inhomogenität der gepackten Zellen wurde durch vorsichtiges Umrühren ausgeglichen. An der Oberfläche eines Erythrozytensedimentes sollen nämlich bevorzugt junge, am Grunde mehr alte Zellen liegen. Die jungen Zellen enthalten gegenüber der Norm mehr K und weniger Na (82). Außerdem sind die Na^{24}- und K^{42}-Austauschraten einzelner Sedimentlagen verschieden (83). Die gepackten Ascites-Zellen wurden in einem Inkubationsmedium mit Bikarbonatzusatz aufgenommen und als Suspension in die Warburg-Gefäße gebracht.

Im Inkubationsmedium waren folgende Bestandteile
ıthalten (Tab. 7):

·t	Suspension (Vol%)	Na^+ (mM/l)	K^+ (mM/l)	Ca^{2+} (mM/l)	Mg^{2+} (mM/l)	PO_4^{3-} (mM/l)	HCO_3 (mM/l)	Glukose (mg%)
ery- ten	25	145	7.5	3.2	7.0	1.3	-	380
s-	12	150	8.0	3.2	6.0	1.1	7.0	330
ry- ten	29	150	8.0	3.5	7.0	1.3	-	390

Tab. 7 Zusammensetzung des Inkubationsmediums verschiedener Zellen. Angabe der Zellkonzentration in Volumen% (Zellvolumen . 100 / Gesamtvolumen)

Die derartig zusammengesetzten Suspensionen wurden
erob bei pH 7.4 - 7.5 inkubiert. Weil bei der durch-
chnittlichen Versuchsdauer von weniger als 5 Stunden
törungen durch Bakterienwachstum nicht zu erwarten sind
34,85), wurde keine Vorsorge für sterile Bedingungen ge-
roffen. Die Gefäße wurden bei 38° C in einem Wasserbad
ıtomatisch bewegt. Die Schüttelfrequenz betrug bei Ery-
ırozytensuspensionen 100 min^{-1}, bei Ascites-Suspensio-
en 160 min^{-1}.

Von der Zellabnahme bis zum Versuchsbeginn ver-

strich im Mittel 1/2 Stunde. Als Versuchsbeginn wurde der Zeitpunkt der Mg^{2+}-Gabe zur Zellsuspension gewählt. Die Zellen wurden zunächst in einem Mg-freien Nährmedium suspendiert. Das Mg^{2+} wurde anschließend zugegeben. Bei Versuchen mit Stoffwechselinhibitoren wurde das Mg^{2+} nach einer 15 Minuten dauernden Vorinkubation der Zellen mit dem jeweiligen Hemmstoff zugesetzt.

Die Versuchsdauer betrug 90 Minuten bei Hühnererythrozyten, 60 Minuten bei Humanerythrozyten und Ascites-Zellen. Dies entsprach ungefähr der Zeit, nach der die Zellen kein Mg^{2+} mehr aufnehmen.

Zu Anfang und zu Ende des Versuches wurde eine bestimmte Menge der Suspension abgenommen. Durch 5 Minuten Zentrifugieren bei 4.000 g wurden die Zellen von der EZF getrennt. Die Zeitspanne zwischen der Abnahme einer bestimmten Suspensionsmenge und dem Sedimentieren der Zelle betrug im Mittel 4 Minuten. Inzwischen war wahrscheinlich schon Mg^{2+} an die Zellmembran gebunden, wie es von Versuchen an der Hefezelle berichtet wird (86,87). Die Differenz der Mg^{2+}-Konzentrationen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende ergibt die Netto-Aufnahme der Zellen.

Bestimmung der EZF in gepackten Zellen:

Zwischen den sedimentierten Zellen liegt noch ein

Teil der EZF. Die Menge dieser EZF wird aus der Verteilung einer Rohrzuckermenge zwischen dem Überstehenden und dem Sediment bestimmt.

Einer Zellsuspension wurde eine bestimmte Menge 14 % Rohrzuckerlösung zugefügt. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 4.000 g wurde die Zuckerkonzentration im Überstehenden und im Zellsediment nach der Methode von Wahler bestimmt (88). Dabei wird die EZF im Sediment nach folgender Formel berechnet:

$$EZF = \frac{R_1 \cdot 100}{R_2} \quad (\%)$$

Es sind

R_1 = Rohrzuckermenge in γ/100 mg Zellen-Leerwert in γ/100 mg Zellen

R_2 = Rohrzuckermenge in γ/100 μl Überstehendes-Leerwert in γ/100 μl Serum

Der Leerwert wurde in Proben ohne Rohrzucker bestimmt. Die Rohrzuckerkonzentration wurde wie folgt gemessen: 200 - 300 mg Zellen wurden nach 10 Minuten Kochen mit 0,8 n NaOH mit 0,25 n HCl neutralisiert und mit 0,28 n $ZnSO_4$ enteiweißt. Im Filtrat wurde Rohrzucker mit Resorcin-Salzsäurereagenz bei 80° C hydrolysiert. Gleichzeitig wurde das sich dabei bildende Oxymethylfurfurol mit Resorcin gekoppelt. Es bildete sich ein roter Farbstoff. Er wurde im Fotometer-Eppendorf bei 509 mμ fotometriert. Die Eichkurve war von 0 - 400 γ linear.

Bestimmung der Haemolyse:

Zur Bestimmung der Totalhaemolyse wurde 1 ml einer 25 % Suspension von Hühnererythrozyten mit 50 ml aqua bidest versetzt. Das Farbstoffgemisch wurde im Fotometer-Eppendorf bei 436 mμ fotometriert. Die bei den einzelnen Versuchen erhaltenen Haemolysewerte wurden in Beziehung zur Haemolyse einer bestimmten Erythrozytenmenge gesetzt. Die Haemolyse war bei Versuchsende nie größer als 4 %.

Mg^{2+}-Bestimmung:

Bei verschiedenen älteren und bis in die Gegenwart gebräuchlichen Verfahren wird das Mg^{2+} entweder als Ammoniumphosphat (89,90) oder als 8-Hydroxyquinolinat (91) gefällt. Hierbei stört das Ca^{2+} die Mg^{2+}-Bestimmung und muß vorher entfernt werden. Beide Verfahren haben deshalb den Nachteil, zeitraubend zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von Orange und Rhein benutzt (92). Sie geht auf Kolthoff zurück. Er fand, daß $Mg(OH)_2$ quantitativ kolorimetrisch mit Hilfe des Adsorptionsindikators Titangelb bestimmt werden konnte (93). Titangelb ist eine aus zwei Molekülen Dihydro-p-toluidin-sulfonsäure zusammengesetzte

Verbindung, die bei alkalischer Reaktion mit Mg^{2+} einen roten Farblack bildet. Als Stabilisator des Farblacks verwendete Garner noch das Schutzkolloid Gummi arabicum (94). Orange und Rhein dagegen benutzten Polyvinylalkohol. - Vorversuche ergaben, daß bei der Methode nach Orange und Rhein die Farbentwicklung bis zu einem Mg^{2+} : Ca^{2+} Verhältnis von 1 : 100 nicht gestört wird.

Bei der Analyse wurde wie folgt verfahren:
Das Überstehende wurde bei Hühner- und Humanerythrozyten ca. 1 : 8, bei Ascites-Zellen ca 1 : 6 verdünnt. Davon wurde 1 ml mit 10 ml Trichloressigsäure (10 g%) enteiweißt. Vom klaren Rückstand wurden 2 ml mit 2 ml Polyvinylalkohol (0,1 g%), 2 ml Titangelb (7,5 mg%) und 4 ml Na OH (7,5 g%) versetzt. Die Extinktion des sich bildenden roten Farblackes wurde bei Zimmertemperatur bestimmt. Als Vergleichswert diente ein Mg^{2+}-freier Leerwert. Die Absorption des Farblacks blieb über 3 Stunden konstant und wurde 1 - 5 Minuten nach der Entwicklung gemessen. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 5 cm.

Die nach dem aufgeführten Prinzip erhaltene Eichkurve verlief entsprechend dem Beer'schen Gesetzt linear von 0 - 10 γ Mg^{2+}/2 ml Meßansatz. Die Messungen wurden innerhalb des Geltungsbereiches des Beer'schen Gesetzes

ausgeführt. Die Eichkurve ist in der Figur 1 dargestellt.

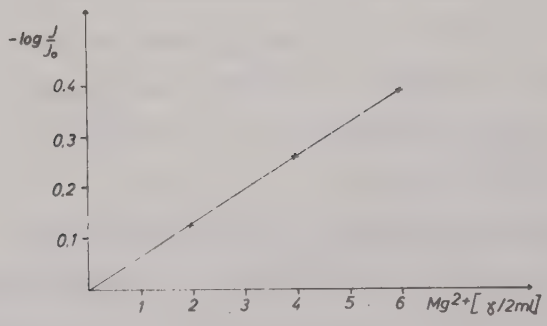

Fig. 1 Eichkurve: Extinktion des Mg-Farblacks von verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen pro 2 ml Meßansatz bei 546 m μ

Berechnung der Mg^{2+}-Aufnahme:

Die in der Küvette gemessene Mg^{2+}-Konzentration gibt die Mg^{2+}-Menge in 2 ml Meßansatz an. Die Mg^{2+}-Konzentration im unverdünnten Überstehenden ergibt sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor. Die zu Anfang und zu Ende des Versuches gemessene Mg^{2+}-Konzentration im unverdünnten Überstehenden ist K_1 und K_2. Es wurde die

Konzentrationsdifferenz K bestimmt. Aus K wurde die Mg^{2+}-Aufnahme ΔMg der in der Suspension enthaltenen Zellen berechnet. Es sind

$$K = K_1 - K_2 \qquad (\mu M/l \text{ EZF})$$

$$Mg = \frac{K \cdot EZF}{Z} \cdot 1000 \qquad (mM/l \text{ Zellen})$$

wobei EZF = Menge der EZF der Zellsuspension in ml/l Suspension

Z = Menge der Zellen in der Zellsuspension in ml/l Suspension

Berechnung der Fehler:

Der mittlere absolute Fehler der Mittelwerte wurde nach folgender Formel berechnet:

$$f = \pm \sqrt{\frac{(M - E)^2}{n(n - 1)}}$$

wobei E = Mittelwert des Einzelversuches

M = Mittelwert mehrerer Versuche

n = Anzahl der gemittelten Versuche

Ergebnisse

Zeitlicher Verlauf der Mg^{2+}-Aufnahme:

Vor der Untersuchung der Faktoren, welche die Mg^{2+}-Aufnahme regulieren, wurde die für eine maximale Mg^{2+}-Permeation benötigte Inkubationsdauer festgestellt. Der Zeitraum, in dem das Mg^{2+} in die verschiedenen Zellen eindringen kann, geht aus der Figur Nr. 2 und der Tabelle 8 hervor. In der Tabelle sind außerdem die bei diesen Versuchen aufgenommenen Mg^{2+}-Mengen und der normale intrazelluläre Mg^{2+}-Gehalt verzeichnet. Es kann abgelesen werden, daß bei ungefähr gleich großer Mg^{2+}-Aufnahme der einzelnen Zellen die Permeationsgeschwindigkeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung verschieden sind. Das Mg^{2+} dringt am schnellsten in menschliche Erythrozyten und am langsamsten in Hühnererythrozyten ein.

Zellart	t_m (min)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Mg_{IZR} (mM/l Zellen)
Menschenery-throzyten	60	1.44 ± 0.18	2.4 x
Ascites-Zellen	60	1.56 ± 0.15	8.1
Hühnererythrozyten	90	1.52 ± 0.13	8.1

Tab. 8 Geschwindigkeit und Größe der Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen bei 38°C. Es sind

t_m = Dauer bis zur maximalen Mg^{2+}-aufnahme in min

Mg_{IZR} = normale intrazelluläre Mg-Konzentration vor Versuchsbeginn

x = Zitat nach (2).

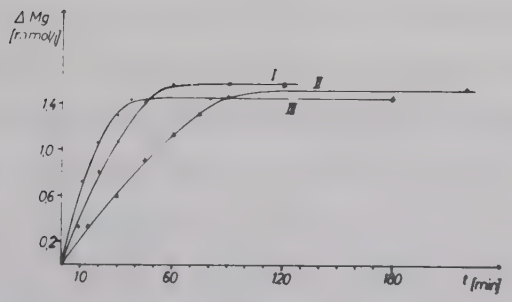

Fig. 2 Zeitliche Abhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) verschiedener Zellen bei 38°C. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Menschen- und Hühnererythrozyten 7.0 mM/l, bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l. Es bedeuten:
Nr. I Ascites-Zellen,
Nr. II Hühnererythrozyten

Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen der EZF:

Damit die Frage entschieden werden kann, ob die Permeation von Mg^{2+} passiv durch Diffusion oder durch einen zwischengeschalteten Mechanismus bewirkt wird, wurde die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten in Abhängigkeit von der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration gemessen. Ein Merkmal von aktiven Substanztransporten ist nämlich die begrenzte Aufnahmegeschwindigkeit bei zunehmenden extrazellulären Konzentrationen (65). Mit einer bestimmten Substratkonzentration arbeitet also ein "transportvermittelnder Prozeß" maximal. Weiteres Steigern der Konzentration der zu transportierenden Substanz hat keine Vergrößerung der Permeation mehr zur Folge. Für diese Erscheinung wird der Ausdruck "Sättigungskinetik" gebraucht.

Die Absättigung der Mg^{2+}-Aufnahme mit steigenden extrazellulären Mg^{2+}-Konzentrationen ist für den Mg^{2+}-Transport in die Hefezelle (78) und in das Intestinum (95) charakteristisch. Gleiches gilt für den Mn^{2+}-Transport in die Hefezelle, wenn man die Mn^{2+}-Aufnahmen als Funktion der Mn^{2+}-Konzentrationen bei einer bestimmten Zeit t darstellt. Die Daten wurden aus den unterschiedlichen Kinetiken der Mn^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Mn^{2+}-Konzentrationen gewonnen (87).

Der Mg^{2+}-Transport in Hühnererythrozyten ist auch durch die Sättigung eines aufnahmelimitierenden Prozesses infolge zunehmender Mg^{2+}-Konzentrationen der EZF gekennzeichnet. Das Maximum der Mg^{2+}-Permeation liegt bei einer Konzentration von 22 mM/l EZF (Fig. 3).

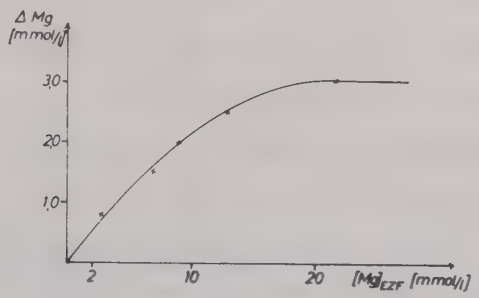

Fig 3 Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) von Hühnererythrozyten bei 38° C als Funktion der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration

Die Beziehung zwischen der Mg^{2+}-Konzentration der EZF und der Mg^{2+}-Aufnahme gehorcht dem Gesetz von Lineweaver und Burk (Fig. 4):

$$1/v = K_m/V_m \cdot S + 1/V_m$$

wobei v = Mg^{2+}-Aufnahmegeschwindigkeit (mM/l Zellen/90 min)

S = Mg^{2+}-Konzentration (mM/l EZF)

K_m = Michaeliskonstante (mM/l)

V_m = Maximalgeschwindigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme (mM/l Zellen/90 min)

Ordnet man nämlich die reziproke Geschwindigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme $^1/_v$ der reziproken Mg^{2+}-Konzentration $^1/_S$ zu, dann ergibt sich eine Gerade (Fig. 4).

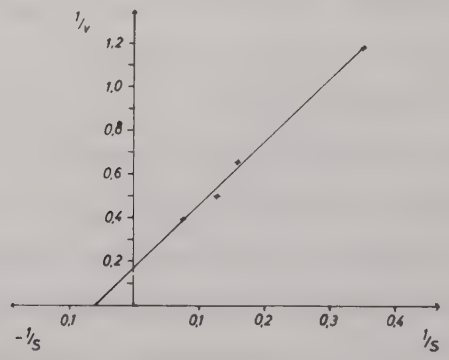

Fig. 4 Michaelis-Menten-Beziehung für die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten in der Darstellung nach Lineweaver und Burk. Ordinate $1/v$ (mM/l Zellen/90 min)$^{-1}$, Abszisse $1/S$ (mM/l EZF)$^{-1}$

Wird diese über $^1/_S = 0$ bis zum Schnittpunkt mit der negativen Abszisse verlängert, dann ist hier $^1/_v = 0$, d.h. $^1/_{V_m} = - {}^{K_m}/_{V_m}.S$ oder $K_m = -(S)$. Es ist $K_m = 1.8 - 10^{-2}$ M/l. Für die Maximalgeschwindigkeit ist bei $^1/_S = 0$ $\quad ^1/_{V_m} = {}^1/_v$ oder $V = V_m$. Bei der Mg^{2+}-Aufnahme ist $V_m = 3.9 \cdot 10^{-3}$ M/l Zellen/h.

Mg^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit vom extrazellulären Na^+:K^+-Verhältnis:

Da die Anwesenheit von Na^+ eine Voraussetzung für den Glukosetransport (96,97) und den Mg^{2+}-Transport (98) ins Intestinum ist, wurde geprüft, ob die Mg^{2+}-Aufnahme der Hühnererythrozyten und damit der Mg^{2+}-Transport zwischen EZF und IZF von der extrazellulären Na^+-Konzentration abhängig ist. Weiterhin wurde die Beziehung zwischen der Mg^{2+}-Aufnahme und der extrazellulären K^+-Konzentration untersucht. Es ist nämlich bekannt, daß der Mg^{2+}-Transport in die Hefezelle durch niedere K^+-Konzentrationen gesteigert und durch höhere K^+-Konzentrationen gehemmt wird (87). Außerdem sind die aktiven Na^+- und K^+-Transporte von Human- und Hühnererythrozyten miteinander gekoppelt (99,100,101).

Aus der Figur Nr. 5 geht hervor, daß die Mg^{2+}-Aufnahme bei konstanter K^+-Konzentration und steigender Na^+-Konzentration zunimmt. In physiologischen Konzentrationen begünstigt das Na^+ die Mg^{2+}-Aufnahme am meisten.

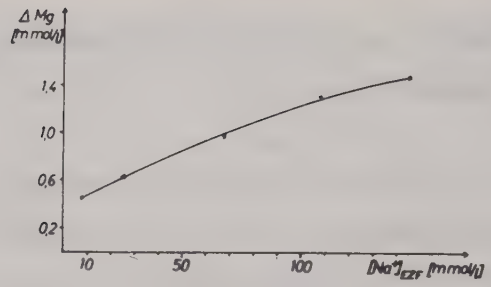

Fig. 5 Mg^{2+}-Aufnahme (Δ Mg) von Hühnererythrozyten bei 38°C in Abhängigkeit von der extrazellulären Na^+-Konzentration bei einer K^+-Konzentration von 7.5 mM/l

Werden umgekehrt die K^+-Konzentrationen bei konstanter Na^+-Konzentration verändert, dann kann die Mg^{2+}-Aufnahme bis zu einem Maximum bei 7.5 mM/l EZF gefördert werden. Höhere K^+-Konzentrationen hemmen die Mg^{2+}-Aufnahme (Fig. 6).

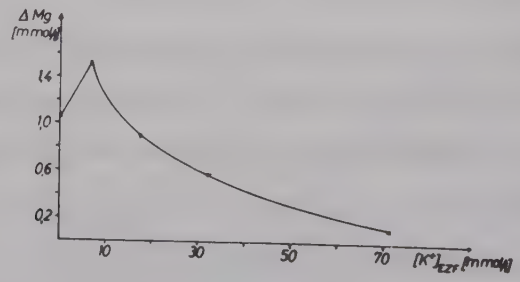

Fig. 6 Mg^{2+}-Aufnahme (Δ Mg) von Hühnererythrozyten bei 38°C in Abhängigkeit von der extrazellulären K^+-Konzentration. Die Na^+-Konzentration ist 145 mM/l

Den Versuchen kann demzufolge entnommen werden, daß die Größe der Mg^{2+}-Permeation vom extrazellulären Verhältnis $Na^+:K^+$ reguliert wird. Eine maximale Mg^{2+}-Aufnahme ist nur möglich, wenn das Medium u. a. 145 mM/l Na^+ und 7.5 mM/l K^+ enthält.

<u>Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen der EZF:</u>

Die Größe der Ionenpermeation in Zellen wird durch das membrangebundene Ca mitbestimmt (102,103). Bei Menschenerythrozyten wird der durch Glykolysehemmung verursachte K^+-Verlust bis auf die Größe des physiologischen Ausflusses verringert, wenn sie mit EDTA inkubiert werden. Dieser Effekt kann nicht durch zusätzliche Gaben von Mg^{2+}, wohl aber durch Ca^{2+} aufgehoben werden (103). Ähnliches wird vom Nerven berichtet, dessen Ruhepotential sich indirekt proportional zur K^+-Konzentration verhält. Bei ihm verursacht die Abnahme der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration eine Senkung des Ruhepotentials (104).

Die Wirkung des Ca^{2+} auf die Na- und K-Verteilung zwischen EZF und IZF ist von seiner Konzentration abhängig. In niederen Konzentrationen bis zu 1 mM/l fördert es den aktiven Na^+-Transport ins Intestinum.

Höhere Ca^{2+}-Konzentrationen vermindern die Na^{+}-Aufnahme (105,106).

Um festzustellen, ob das Ca^{2+} auf den Mg^{2+}-Transport einen Einfluß hat, wurde die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen untersucht (Fig. 7). Hierbei er-

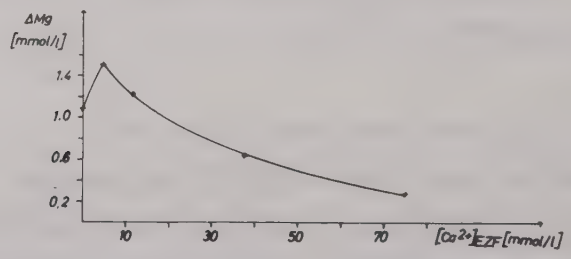

Fig. 7 Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) von Hühnererythrozyten bei 38°C unter dem Einfluß der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration bei optimaler Na^{+}-Konzentration von 145 mM/l und K^{+}-Konzentration von 7.5 mM/l

gab sich, daß Ca^{2+} bis zu einer Konzentration von 3 mM/l EZF die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten fördert. Darüber liegende Ca^{2+}-Konzentrationen hemmen die Mg^{2+}-Permeation. Bei einem Verhältnis Mg^{2+} : Ca^{2+} = 0,1 ist die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten und Hefezellen (87) zu 80 % gehemmt. Übereinstimmend damit ist bei ei-

nem Verhältnis Mn^{2+} : Ca^{2+} = 0,1 die Mn^{2+}-Aufnahme von menschlichen Erythrozyten zu 83 % gehemmt (107). Umgekehrt kann auch durch Mg^{2+} die Ca^{2+}-Aufnahme von menschlichen Erythrozyten gehemmt werden (108).

Mg^{2+}-Aufnahme bei Anwesenheit von Glycin oder Indolacetat in der EZF:

Bakterien nehmen Glycin nur bei Anwesenheit von Mg^{2+} auf (109). Da Vogelerythrozyten (110, 111) und Ascites-Zellen (112,113) Glycin aktiv transportieren, wäre es möglich, daß bei ihnen Mg^{2+} nach Komplexbildung mit Glycin vermehrt eingeschleppt wird. Dieses ist jedoch nicht der Fall (Tab. 9). Bei Hühnererythrozyten haben

Zellart	Glycin (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15
	5	1.54 ± 0.03
Hühnererythrozyten	0	1.52 ± 0.13
	5	1.52 ± 0.03
	11	1.52 ± 0.07
	25	1.47 ± 0.04
	65	1.60 ± 0.09

Tab. 9 Mg^{2+}-Aufnahme von Ascites-Zellen und Hühnererythrozyten bei 38°C bei Anwesenheit von Glycin in der extrazellulären Flüssigkeit.

steigende Glycinkonzentrationen keinen Einfluß auf die Mg^{2+}-Aufnahme. Ähnlich ist es bei Ascites-Zellen. Es muß also angenommen werden, daß die Mg^{2+}-Aufnahme durch die Glycinkomplexbildung nicht gestört wird. Analog könnte bei der Glycinaufnahme von Bakterien das Mg^{2+} mit in die Zelle geschleppt werden.

Die Glycinaufnahme kann bei Ascites-Zellen mit Hilfe von Indolacetat gesteigert werden. Das Maximum der Indolacetatwirkung liegt bei ca. 16 mM/l. Gleichzeitig wird die K^{+}-Aufnahme der Zellen gehemmt (114). Die Mg^{2+}-Permeation in Ascites-Zellen und Hühnererythrozyten wird durch Indolacetat ebenfalls vermindert (Tab. 10).

Zellart	Indolacetat (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	17	1.06 ± 0.01	68
Hühnererythrozyten	0	1.52 ± 0.13	100
	3	0.86 ± 0.20	57
	6	0.82 ± 0.10	54
	12	0.76 ± 0.08	50
	27	0.68 ± 0.08	45

Tab. 10 Mg^{2+}-Aufnahme von Ascites-Zellen und Hühnererythrozyten bei 38°C unter dem Einfluß von extrazellulärem Indolacetat.

Abhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme von der Glukoseaufnahme:

Die Anwesenheit von Glukose in der EZF ist eine Voraussetzung für den aktiven Mg^{2+}-Transport in die Hefezelle (87). Daher wurde der Frage nachgegangen, ob dies auch für die Mg^{2+}-Aufnahme der tierischen Zelle gilt.

Aus den Versuchen geht hervor, daß mit steigenden Glukosekonzentrationen die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten vergrößert wird (Fig. 8). Mit einer Glukosekonzentration von 700 mg% kann der Mg^{2+}-Transport maximal gesteigert werden.

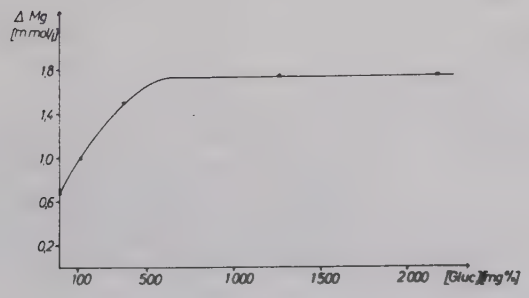

Fig. 8 Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) von Hühnererythrozyten bei 38°C in Abhängigkeit von der extrazellulären Glukosekonzentration.

Die Abhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme von der Anwesenheit und Aufnahme der Glukose wird durch Versuche mit Phlorizin unterstrichen. Phlorizin ist ein Hemmstoff für den Glukoseübertritt in Erythrozyten (115,116,117) und Ascites-Zellen (118). Es greift an der Membran an, ohne selber in die Zelle einzudringen (118,119,120).

Bei Hühnererythrozyten, Ascites-Zellen und menschlichen Erythrozyten wird die Mg^{2+}-Aufnahme durch Phlorizin gehemmt (Tab. 11). Die verbleibende Mg^{2+}-Aufnahme

Zellart	Phlorizin (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Hühnererythrozyten	0	1.52 ± 0.13	100
	1.3	0.70 ± 0.01	46
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	1.1	0.83 ± 0.02	53
Humanerythrozyten	0	1.44 ± 0.18	100
	1.3	0.65 ± 0.03	45

Tab. 11 Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen bei 38°C unter dem Einfluß von Phlorizin in der EZF. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Menschen- und Hühnererythrozyten 7.0 mM/l, bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l.

beträgt je nach Zelltyp 45 - 53 % der Kontrolle. Es kann demnach ein glukoseabhängiger und glukoseunabhängiger Teil der Mg^{2+}-Aufnahme unterschieden werden.

Mg^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit von verschiedenen PO_4^{3-}-Konzentrationen der EZF:

Eine der Bedingungen für den aktiven Mg^{2+}-Transport in die Hefezelle ist die vorhergehende Aufnahme von PO_4^{3-} aus der EZF (87). Die PO_4^{3-}-Aufnahme ist von der Mg^{2+}-Anwesenheit unabhängig (121). Mit steigenden Phosphatkonzentrationen der EZF kann die Mg^{2+}-Aufnahme von Hefezellen vergrößert werden (87). Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten, bei denen mit Ansteigen der PO_4^{3-}-Konzentration der EZF die Mg^{2+}-Aufnahme vergrößert wird (Fig. 9).

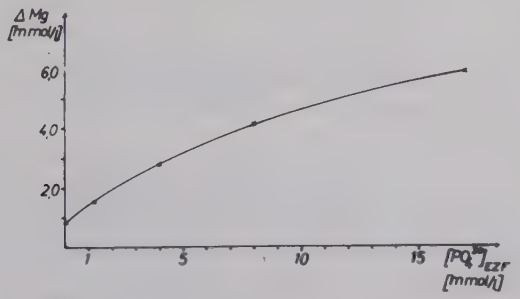

Fig. 9 Mg^{2+}-Aufnahme (Δ Mg) von Hühnererythrozyten bei 38°C in Abhängigkeit von der extrazellulären PO_4^{3-}-Konzentration

Die PO_4^{3-}-Abhängigkeit des Mg^{2+}-Transportes wird außerdem mit Hilfe von AsO_4 geprüft, das aufgrund der Stellung des As im Periodischen System der Elemente PO_4^{3-} kompetetiv verdrängen kann, ohne es zu ersetzen. Die durch AsO_4 bewirkte Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung (122,123,124) und die Unterbrechung der Substratkettenphosphorylierung (125-127) finden hierin ihre Erklärung.

Bei Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen und Humanerythrozyten übt das AsO_4 einen hemmenden Einfluß auf die Mg^{2+}-Aufnahme aus. In allen Fällen ist die Mg^{2+}-Aufnahme auf ca. die Hälfte vermindert (Tab. 12).

Zellart	AsO_4 (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Hühner-erythrozyten	0	1.52 ± 0.13	100
	3.8	0.79 ± 0.01	52
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	3.3	0.65 ± 0.01	42
Humanery-throzyten	0	1.44 ± 0.18	100
	3.9	0.78 ± 0.08	54

Tab. 12 Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen bei 38°C bei Anwesenheit von Arsenat in der EZF. Die Zellen wurden mit Arsenat in Mg^{2+}-freiem Medium 15 min vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Menschenerythrozyten und Hühnererythrozyten 7.0 mM/l,

Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen:

Die Prüfung der Temperaturabhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme soll Auskunft geben, ob diese passiv oder stoffwechselabhängig erfolgt. Es zeigt sich, daß der Mg^{2+}-Transport in Hühnererythrozyten deutlich von der Inkubationstemperatur abhängig ist (Tab. 13).

t	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
0	0.65 ± 0.04	43
28	1.10 ± 0.03	72
38	1.52 ± 0.13	100
48	0.66 ± 0.04	42

Tab. 13 Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellen wurden im Mg^{2+}-freien Medium 15 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert

Bei 38° C ist die Mg^{2+}-Aufnahme am größten. Mit niederen und höheren Temperaturen dringt weniger Mg^{2+} ein. Bei 0° C permeieren noch 0,65 mM Mg^{2+}/l Zellen, das sind ca. 43 % der Kontrolle bei 38° C. Die stoffwechselunabhängige Mg^{2+}-Aufnahme bei 0° C ist damit fast gleich groß wie die stoffwechselabhängige Mg^{2+}-Aufnahme bei 38° C.

Für die Temperatur zwischen 28 - 38° C werden die Aktivierungsenergie und der Temperaturkoeffizient der Mg^{2+}-Aufnahme berechnet. Die Aktivierungsenergie E ist in folgender Gleichung enthalten:

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \qquad \text{oder}$$

$$E = \frac{4{,}575 \; T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \log \frac{k_2}{k_1} \qquad (\text{cal } M^{-1})$$

Hierbei sind: $T_2 > T_1$ (° Kelvin)

R = Gaskonstante 1.987 cal/Mol.Grad

k_2 = Permeationsgeschwindigkeit bei T_2

k_1 = Permeationsgeschwindigkeit bei T_1

Der Temperaturkoeffizient ist $Q_{10} = \frac{k_2}{k_1}$

Für die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten wird bei einem Q_{10} = 1,38 die Aktivierungsenergie E = 5700 cal M^{-1} berechnet.

<u>Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von Glykolysegiften:</u>

Da die Glykolyse möglicherweise die Energiequelle für den stoffwechselabhängigen Mg^{2+}-Transport ist, wird die Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von Mono-

jodacetat und Natriumfluorid bestimmt. Beide Verbindungen sind spezifische Glykolyseinhibitoren.

Monojodacetat greift an der Stelle der Triosephosphatdehydrogenasereaktion ein (138) und soll als Sulfhydrylgruppenreagens (129,130) den Teilreaktionsschritt der Oxydation des Aldehyds zum Thiolester hemmen (130). Unter seiner Wirkung bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M/l wird in Humanerythrozyten der ATP-Bestand in 25 Minuten um 90 % vermindert. Ebenso groß ist die Hemmung des P^{32}-Einbaus in die Zelle (131).

Fluorid hemmt die Enolasereaktion der Glykolyse (132,133). Bei höheren Konzentrationen des Inhibitors wird außerdem noch die Permeabilität der Zellmembran verändert (134,135). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fluoridkonzentration gewählt, die nur zur Glykolysehemmung führt.

Die genannten Inhibitoren verringern die Mg^{2+}-Aufnahme von glykolysierenden Ascites-Zellen und Humanerythrozyten (Tab. 14). Bei den atmenden Hühnererythrozyten haben die Glykolysegifte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die Mg^{2+}-Permeation.

Zellart	Jodacetat (mM/l EZF)	NaF (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Hühnererythrozyten	0	0	1.52 ± 0.13	100
	3.8	0	1.57 ± 0.12	103
	0	1.3	1.48 ± 0.07	98
Ascites-Zellen	0	0	1.56 ± 0.15	100
	3.3	0	0.92 ± 0.05	59
Humanerythrozyten	0	0	1.44 ± 0.18	100
	3.9	0	0.82 ± 0.16	57

Tab. 14 Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen bei 38°C in Abhängigkeit von Jodacetat oder Natriumfluorid in der EZF nach 15 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l, bei Hühner- und Menschenerythrozyten 7.0 mM/l.

Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß des Atmungsgiftes Cyanid:

Mit Hilfe des Cyanids soll geklärt werden, inwieweit die Mg^{2+}-Aufnahme von der Atmung abhängig ist. Cyanid ist seit den Arbeiten von Warburg als spezifischer Hemmstoff der Cytochrom c-Oxydase bekannt (136,137). Mit 10^{-3} M/l des Giftes kann eine maximale Atmungshemmung erzielt werden (138). Die Folge der Cyanidvergiftung ist ein rascher ATP-Abbau. Das ATP von Taubenerythrozyten wird bei einer Cyanidkonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M/l in 25 Minuten zu 80 - 85 % abgebaut. In der gleichen Größenordnung liegt die Hemmung des P^{32}-

Einbaus in alle Phosphatfraktionen (131).

Aus der Tabelle 15 kann entnommen werden, daß die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen durch Cyanid vermindert wird. Die Mg^{2+}-Permeation in

Zellart	KCN (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Hühnererythrozyten	0	1.52 ± 0.13	100
	1.3	0.72 ± 0.02	47
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	1.1	0.97 ± 0.01	62
Humanerythrozyten	0	1.44 ± 0.18	100
	1.3	1.44 ± 0.02	100

Tab. 15 Einfluß von KCN auf die Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen, die 15 min in Mg^{2+}-freiem Medium mit dem Inhibitor vorinkubiert wurden. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Human- und Hühnererythrozyten 7.0 mM/l, bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l.

glykolysierende Humanerythrozyten bleibt unverändert. Dies ist mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen vergleichbar, denen zufolge der Mg^{2+}-Transport in die Hefezelle durch Cyanid gehemmt wird (139). Entsprechendes gilt für den aktiven Na^+- und K^+-Transport in kernhaltige Erythrozyten (80,101,140) und Ascites-Zellen (141).

Mg^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von Entkopplern:

Um festzustellen, ob die Energie der Atmung über die Bildung von ATP für die Mg^{2+}-Aufnahme nutzbar gemacht wird, wurde die Mg^{2+}-Aufnahme in Gegenwart der Entkoppler 2.4 DNP und Azid untersucht.

2.4 DNP ist nach Loomis und Lipmann ein Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung (142), indem es die mit dem Elektronentransport in der Atmungskette verbundene Phosphorylierung des ADP mit anorganischem Phosphat unterbindet (143,144,145). Die Folge ist eine vom Anwachsen der ATP-ase Aktivität begleitete Atmungssteigerung. Bei höheren Konzentrationen wird der P^{32}-Einbau verringert und die Atmung gehemmt (146).

Azid ist ebenso wie DNP ein Entkoppler. Seine Wirkung auf die Mitochondrien ist durch das Senken des P:O-Quotienten und Verminderung der Atmung gekennzeichnet (142). Es hat dabei einen anderen Angriffspunkt als DNP, da es keine ATP-ase stimulierende Wirkung besitzt und keinen Einfluß auf die P_a-Austauschgeschwindigkeit von ADP-ATP nimmt (147).

Nach den vorliegenden Ergebnissen haben die Entkoppler auf die Mg^{2+}-Aufnahme von glykolysierenden Humanerythrozyten keinen Einfluß (Tab. 16, 17). Dagegen wird bei den atmenden Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen die Mg^{2+}-Aufnahme mit Azid und DNP gehemmt. Be-

zogen auf den Kontrollwert, ist der Wirkungsgrad des DNP bei Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen etwa gleich groß. Die Verminderung der Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen ist proportional zu der DNP-Konzentration (Fig. 12, 13).

Zellart	2.4 DNP (M/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Hühnererythrozyten	0	1.52 ± 0.13	100
	$2.4 \cdot 10^{-4}$	1.28 ± 0.10	83
	$2.2 \cdot 10^{-3}$	0.93 ± 0.00	60
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	$2.2 \cdot 10^{-4}$	0.39 ± 0.05	89
	$2.2 \cdot 10^{-3}$	0.78 ± 0.00	55
Humanerythrozyten	0	1.44 ± 0.18	100
	$2.6 \cdot 10^{-4}$	1.44 ± 0.07	100
	$3.2 \cdot 10^{-3}$	1.48 ± 0.04	103

Tab. 16 Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen in Abhängigkeit von der extrazellulären DNP-Konzentration. Die Zellen wurden 15 min in Mg^{2+}-freiem Medium mit dem Entkoppler vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist bei Human- und Hühnererythrozyten 7.0 mM/l, bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l.

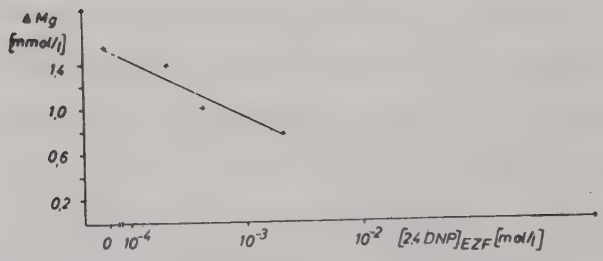

Fig. 10 Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) von Hühnererythrozyten bei 38°C als Funktion der extrazellulären DNP-Konzentration. Die Zellen wurden 15 min mit dem Entkoppler in Mg^{2+}-freiem Medium vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist 7.0 mM/l.

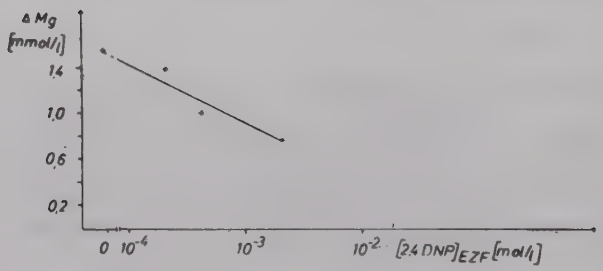

Fig. 11 Mg^{2+}-Aufnahme (ΔMg) von Ascites-Zellen bei 38°C als Funktion der extrazellulären DNP-Konzentration. Die Zellen wurden 15 min mit dem Entkoppler in Mg^{2+}-freiem Medium vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist 6.0 mM/l

Zellart	N_3Na (mM/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
ihnererery- irozyten	0 3.8	1.52 ± 0.13 0.75 ± 0.07	100 49
scites- ellen	0 3.3	1.56 ± 0.15 0.83 ± 0.03	100 53
imanery- irozyten	0 4.0	1.44 ± 0.18 1.44 ± 0.17	100 100

Tab. 17 Mg^{2+}-Aufnahme verschiedener Zellen bei 38°C bei Anwesenheit von Natriumazid in der extrazellulären Flüssigkeit. Die Zellen wurden 15 min in Mg^{2+}-freiem Medium mit Azid vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist 7.0 mM/l bei Menschen- und Hühnererythrozyten, bei Ascites-Zellen 6.0 mM/l

Ein ähnliches Bild bietet sich beim aktiven Na^+- nd K^+-Transport in Erythrozyten mit verschiedenem toffwechsel. Der Na^+-K^+-Transport wird bei Hühner- rythrozyten durch DNP (101,135) und Azid (135) ge- emmt. Bei Humanerythrozyten haben jedoch DNP und Azid 135) keinen Einfluß auf die Na-K-Verteilung.

g^{2+}-Aufnahme unter dem Einfluß von g-Strophanthin:

Strophanthin wurde bei Untersuchungen von Kationen- ransporten vielfach verwendet, um zu klären, ob deren ufnahme auf aktivem Wege erfolgt. Mit Hilfe des Inhi-

bitors ist es nach Schatzmann möglich, den aktiven Na^+- und K^+-Transport von menschlichen Erythrozyten ohne Veränderung der Glykolyse zu hemmen. Er nahm deshalb an, daß Strophanthin direkt am Trägermolekül für den Na^+- und K^+-Transport angreift (148). Diese Ergebnisse wurden von einer Reihe anderer Autoren bestätigt (149,150, 151). Die gleiche Glykosidwirkung wurde auch an Ascites-Zellen (152), am Herz- (153,154) und Skelettmuskel (155), am Riesenaxon (156,157) und an Gehirnschnitten (158,159) festgestellt. Da bei allen untersuchten Strophanthinkonzentrationen der Glukoseverbrauch (152,160) und der Gehalt an energiereichem Phosphat (161,162) gleich blieben, war eine stoffwechselunabhängige Hemmung des Trägermechanismus nicht mehr zu bezweifeln.

Um zu klären, ob auch die Mg^{2+}-Aufnahme auf einem aktiven Vorgang beruht, wurde untersucht, ob sie von Strophanthin beeinflußt wird. Hierbei hat sich ergeben, daß Strophanthin-g die Mg^{2+}-Aufnahme von tierischen Zellen vermindert (Fig. 12, Tab. 18). Die noch verbleibende Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten war bei einer Strophanthinkonzentration von $1.3 \cdot 10^{-3}$ M/l etwas kleiner als die stoffwechselunabhängige Mg^{2+}-Aufnahme bei 0° C.

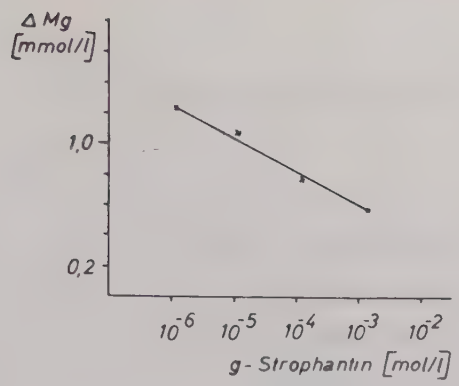

Fig. 12 Mg^{2+}-Aufnahme (Δ Mg) von Hühnererythrozyten bei 38°C als Funktion der extrazellulären Strophanthin-g Konzentration. Die Zellen wurden 15 min in Mg^{2+}-freiem Medium mit Strophanthin vorinkubiert

Zellart	g-Strophanthin (M/l EZF)	Aufnahme (mM/l Zellen)	Aufnahme (% der Kontrolle)
Ascites-Zellen	0	1.56 ± 0.15	100
	$1.1 \cdot 10^{-3}$	0.74 ± 0.02	48
Humanerythrozyten	0	1.44 ± 0.18	100
	$1.3 \cdot 10^{-4}$	0.71 ± 0.04	49

Tab. 18 Mg^{2+}-Aufnahme von Ascites-Zellen und Humanerythrozyten bei 38°C unter dem Einfluß von Strophanthin-g in der extrazellulären Flüssigkeit. Die Zellen wurden 15 min mit Strophanthin in Mg^{2+}-freiem Medium vorinkubiert. Die extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration ist 6.0 mM/l bei Ascites-Zellen, bei Humanerythrozyten 7.0 mM/l.

Diskussion

Die graphische Darstellung der Mg^{2+}-Aufnahme von Vogelerythrozyten als Funktion der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration gleicht dem Bild einer Adsorptionsisothermen. Das gleiche gilt für die Mg^{2+}-Aufnahme der Hefezelle (87) und des Intestinums (95). Bei der Anwendung auf Ionenaufnahmen von Zellen entspricht die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme formal der Michaelis-Menten-Gleichung (163,164). Beide Beziehungen beschreiben in diesem Fall einen Vorgang, bei dem ein membrangebundener Reaktionspartner limitierend wirkt.

Über die Art und die Bedingungen der Mg^{2+}-Aufnahme sagt dieser Versuch nichts aus. Einen näheren Einblick kann aber die Temperaturabhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme geben. Bei 38° C inkubierte Hühnererythrozyten nehmen 1.52 mM Mg^{2+}/l Zellen auf. Bei 0° C permeieren wegen des darniederliegenden Stoffwechsels nur noch 0.65 mM/l Zellen. Daraus läßt sich ableiten, daß ein Teil des Mg^{2+}, nämlich 0,65 mM/l Zellen, wegen der hohen extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration passiv in die Zellen diffundiert, während 0,87 mM/l Zellen stoffwechselabhängig aufgenommen wird.

Ein Hinweis auf die Natur der stoffwechselbedingten Mg^{2+}-Permeation ergibt sich aus der Abhängigkeit der

Mg^{2+}-Aufnahme von der Anwesenheit von Glukose. Wird die Glukoseaufnahme mit Hilfe von Phlorizin unterbrochen, dann ist die Mg^{2+}-Aufnahme auf Werte verringert, die denen der passiven Diffusion gleichen.

Nähere Einsichten über den Ablauf der stoffwechselgebundenen Mg^{2+}-Aufnahme lassen sich mit verschiedenen Stoffwechselinhibitoren gewinnen. Da die Mg^{2+}-Aufnahme infolge der mit Arsenat ausgelösten Unterbrechung der PO_4^{3-}-abhängigen Reaktionen bis auf die Größe der passiven Diffusion verringert ist, kann abgeleitet werden, daß der stoffwechselgebundene Mg^{2+}-Transport in die tierische Zelle von einer Phosphorylierungsreaktion abhängig ist. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Rothstein (87) und Jennings (165) überein, wonach die Bildung eines Phosphatesters die Voraussetzung für eine Mg^{2+}-Aufnahme ist.

Diese Annahme wird durch Versuche mit Giften der Atmung und der Glykolyse unterstützt. Die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten kann nämlich durch das Atmungsgift Cyanid und die Aufnahme von Menschenerythrozyten mit Hilfe des Glykolysegiftes Jodacetat erheblich gesenkt werden. Bei Ascites-Zellen kann die Mg^{2+}-Aufnahme mit Giften der Atmung oder der Glykolyse gehemmt werden. Die Abhängigkeit der Mg^{2+}-Aufnahme von der Atmung einerseits und der Glykolyse andererseits legt daher nahe, daß nicht einzelne Reaktionsschritte des jeweiligen

Stoffwechsels, sondern das ATP fördernd auf die Mg^{2+}-Permeation einwirkt.

Die Annahme, daß die Mg^{2+}-Aufnahme von ATP abhängig ist, wird durch Versuche mit Entkopplern der oxydativen Phosphorylierung bewiesen: Hühnererythrozyten nehmen unter dem Einfluß von DNP und Azid nur soviel Mg^{2+} auf, wie etwa passiv in die Zelle diffundiert. Analog ist auch der Na^{+}- und K^{+}-Transport in die tierische Zelle von der Anwesenheit des ATP abhängig (131,166,167). Die Rolle der energiereichen Phosphate beim aktiven Kationentransport wurde besonders deutlich an Cyanid- oder DNP-vergifteten Riesenaxonen demonstriert, bei denen der Na^{+}-Efflux nach der Injektion von ATP wieder normalisiert werden konnte (168,169).

Die Versuche mit den Stoffwechselinhibitoren und verschiedenen Temperaturen zeigen, daß bei den Versuchsbedingungen dieser Arbeit (erhöhte extrazelluläre Mg^{2+}-Konzentration) die Mg^{2+}-Aufnahme aus einer passiven, durch Diffusion bedingten und einer stoffwechselabhängigen Komponente besteht. Da der passive Anteil der Mg^{2+}-Aufnahme proportional der extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration sein muß, ist es möglich, die Größe der aktiven Mg^{2+}-Aufnahme bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen der EZF zu berechnen, indem von der gesamten Mg^{2+}-Aufnahme die passive Komponente abgezogen wird. Die auf dieser Basis bestimmte Michaelis-Konstante ist

$K_m = 6 \cdot 10^{-3}$ M/l. Sie liegt in der Größenordnung der für den aktiven K-Transport von menschlichen Erythrozyten angegebenen Konstanten $K_m = 2{,}1 \cdot 10^{-3}$ M/l (170).

Weiterhin läßt sich die Aktivierungsenergie für die stoffwechselgeförderte Mg^{2+}-Aufnahme berechnen. Bei einem Temperaturkoeffizienten $Q_{10} = 1.94$ würde sie $E = 12$ kcal M^{-1} betragen. Sie liegt demnach im Bereich der Aktivierungsenergien, die für den aktiven Na^+ und K^+-Transport von Humanerythrozyten angegeben wurden, denn für Na^+ ist $E = 15$ kcal M^{-1} (171) und für K^+ ist $E = 14$ kcal M^{-1} (100.

In Analogie zu den Verhältnissen beim aktiven Na^+- und K^+-Transport könnte von der hohen Aktivierungsenergie für die stoffwechselbegünstigte Mg^{2+}-Aufnahme auf eine limitierend wirkende fermentative Aufnahmereaktion geschlossen werden. Da sich aber bei Modellversuchen mit Membranen für die Permeation einer Substanz Aktivierungsenergien von der Größenordnung aktiv transportierter Kationen ergeben haben sollen (172), kann der Einspruch erhoben werden, daß hohe Aktivierungsenergien auch physikalischer Ausdruck des Diffusionswiderstandes der Zellmembran sind (140). Aus der Hemmung der Mg^{2+}-Aufnahme durch Stoffwechselinhibitoren folgt aber, daß die Mg^{2+}-Aufnahme durch enzymatische Reaktionen gefördert wird. Die Werte der Aktivierungsenergie stimmen mit diesem Ergebnis überein.

Wie aus dem Vorangehenden hervorgeht, herrschen beim aktiven Na^+- und K^+-Transport und dem stoffwechselabhängigen Mg^{2+}-Transport analoge Verhältnisse. Für den Transport von Na^+ und K^+ wurde von Post eine ATP-ase verantwortlich gemacht (170). Über den Ablauf der in der Membran lokalisierten ATP-ase Reaktion machte Skou folgende Angaben: Voraussetzung für die Aktivität des Fermentes ist die Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP. Dabei bildet sich ein Enzym-Mg2-ATP-Komplex. Durch die Gabe von Na^+ und K^+ kann eine zusätzliche Aktivierung des Enzyms ausgelöst werden. Na^+ und K^+ sollen dabei auf verschiedenen Seiten des Enzyms gebunden werden. Nach der Phosphorylierung des Enzyms werden 2 Mg und ADP freigesetzt. Anschließend gibt das Enzym mit dem Zerfall seiner energiereichen Phosphatbindung Na und K ab. Die Geschwindigkeit des Na^+- und K^+-Transportes soll durch die Enzymaktivität bestimmt werden. Diese ist von der Na^+- und K^+-Konzentration abhängig. Den Ablauf dieser Reaktion gibt folgendes Schema wieder (173,174):

$$E + ATP + 2\,Mg + nNa + mK \rightleftharpoons \overset{mK}{\underset{nNa}{E\ Mg2\ ATP}} \quad (1)$$

$$\downarrow\uparrow$$

$$\overset{mK}{\underset{nNa}{E}}\quad P + 2\,Mg + ADP \quad (2)$$

$$\downarrow$$

$$E + P_a + nNa + mK \quad (3)$$

wobei E = Enzym

$\binom{n}{m}$ = unbekannte Zahl

P_a = anorganisches Phosphat

Die den Ablauf der ATP-Hydrolyse bestimmenden Faktoren regulieren auch die Mg^{2+}-Aufnahme. Dies gilt u. a. für die charakteristische Abhängigkeit der ATP-ase Aktivität bzw. der Mg^{2+}-Aufnahme von der angewandten Mg^{2+}-Konzentration. Der Verlauf beider Prozesse ist bei ansteigenden Mg^{2+}-Konzentrationen durch eine Sättigungskinetik gekennzeichnet. Während bei der Nerven-ATP-ase bei den konstanten Konzentrationen von Na^+ 100 mM/l, K^+ 20 mM/l, Ca^{2+} 1 mM/l und ATP 3 mM/l die maximale Aktivität bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 20 mM/l erreicht ist (173), liegt die maximale Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten bei der Mg^{2+}-Konzentration von ca. 22 mM/l EZF.

Weiterhin werden die ATP-ase Reaktion und die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten vom Na^+:K^+-Verhältnis reguliert. Im Fall der alleinigen Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP ist die ATP-ase Aktivität klein. Durch den Zusatz von Na^+ und K^+ kann jedoch die ATP-Hydrolyse gesteigert werden (173,174,175). Mit einem Anwachsen der K^+-Konzentration ist ein Anstieg der Aktivität der Nieren-ATP-ase bis zu einem Maximum verbunden, d. h. höhere K^+-Konzentrationen wirken hemmend (174). Nach dem Überschreiten einer bestimmten Konzentration greifen die K^+-Ionen nämlich kompetetiv am enzymatischen Bindeort des Na^+ an (173). In analoger Weise ist die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten bei Abwesenheit von Na^+ oder K^+

klein. Sie wird ebenfalls durch niedere K^+-Konzentrationen gesteigert und durch höhere Konzentrationen gehemmt. Die bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 6 mM/l für den Ablauf der Nieren-ATP-ase optimale Na^+-Konzentration von 145 mM/l und K^+-Konzentration von ca. 7.4 mM/l (174) decken sich mit den für die größtmögliche Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten gefundenen Na^+- und K^+-Konzentrationen.

Der Einfluß des Ca^{2+} auf die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten und auf die ATP-ase Reaktion menschlicher Erythrozyten ist ebenfalls ähnlich. Die Aktivität der ATP-ase von menschlichen Erythrozyten (175) wird ähnlich wie die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten durch geringe Mengen von Ca^{2+} bis zu einem Maximum bei ca. 1 mM Ca^{2+}/l gesteigert. Höhere Ca^{2+}-Konzentrationen wirken auf die ATP-Spaltung hemmend. Dies geht auf die Konkurrenz des Ca^{2+} mit dem Mg^{2+} an der ATP-ase zurück (173,175). Entsprechend wird auch die Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten bis zu 3 mM Ca^{2+}/l gesteigert. Darüber liegende Ca^{2+}-Konzentrationen hemmen die Mg^{2+}-Aufnahme.

Schließlich gleicht sich das Verhalten der ATP-ase Reaktion und der Mg^{2+}-Aufnahme der tierischen Zelle gegenüber Strophanthin, dem spezifischen Hemmstoff für den aktiven Na^+- und K^+-Transport. Strophanthin unterbindet die Na^+-K^+-aktivierte ATP-ase Reaktion fast voll-

ständig (170,173,175), indem es die Bindung von Na^+ und K^+ an das Enzym verhindert (173). Für die maximale Hemmung der ATP-ase von menschlichen Erythrozyten muß, wie aus einer Darstellung der Fermentaktivität als Funktion der Konzentration von g-Strophanthin hervorgeht, eine Inhibitorkonzentration von $6 \cdot 10^{-4}$ M/l vorliegen (170). Die gleiche Konzentration ist für die vollständige Blockierung der stoffwechselabhängigen Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten notwendig, wenn, ausgehend von der Gesamtaufnahme bei verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen, die Hemmung nur auf den aktiven Teil der Mg^{2+}-Permeation bezogen wird.

Weil für die Regulierung der ATP-ase Aktivität und der aktiven Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten gleiche Faktoren verantwortlich sind, läßt sich der Mechanismus des Na^+- und K^+-Transportes mittels der ATP-ase auf den stoffwechselabhängigen Mg^{2+}-Transport übertragen.

In welcher Weise dieser Mechanismus funktionieren könnte, zeigt das oben genannte Schema von Skou. In der Reaktion (2) zerfällt der Enzym-Mg-ATP-Na-K-Komplex unter Freisetzung von Mg. Wenn Bildung und Zerfall dieses Komplexes an verschiedenen Stellen der Membran erfolgen, resultiert hierdurch ein gerichteter Transport von Mg^{2+}. Außerdem ist der Zerfall dieses Komplexes mit einer Umwandlung von ATP in ADP verbunden. Da ADP eine ca. 10 mal kleinere Komplexbildungskonstante mit Mg^{2+} hat, müssen bei dieser Reaktion Mg^{2+}-Ionen freiwerden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mg^{2+}-Aufnahme von tierischen Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen. Nach dem Gesichtspunkt ihres unterschiedlichen Energiestoffwechsels wurden folgende Zellen verwendet:

1. atmende kernhaltige Vogelerythrozyten,
2. glykolysierende Humanerythrozyten und
3. Ascites-Tumorzellen, die ihren Energiebedarf aus der Glykolyse und Atmung decken.

Die Menge des aufgenommenen Mg^{2+} wurde aus der Differenz der extrazellulären Konzentrationen zwischen Anfang und Ende des Versuches bestimmt. Bei einer extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration von 6 - 7 mM/l ist die Aufnahme bei den untersuchten Zellen etwa gleich groß. Sie ist bei Ascites-Zellen sowie Humanerythrozyten nach 60 Minuten, bei Hühnererythrozyten nach 90 Minuten abgeschlossen. Mit steigenden extrazellulären Mg^{2+}-Konzentrationen nimmt die Aufnahme zu und erreicht bei Hühnererythrozyten bei 22 mM Mg^{2+}/l einen Sättigungswert.

Die Mg^{2+}-Aufnahme der verschiedenen Zellen ist stoffwechselabhängig. Dies ergibt sich aus folgendem: Bei 0^{o} C ist die Mg^{2+}-Aufnahme unter den gewählten Versuchsbedingungen herabgesetzt. Die Mg^{2+}-Aufnahme ist abhängig von der Anwesenheit von Substrat, denn bei hohem Glukoseangebot nehmen Hühnererythrozyten mehr Mg^{2+} auf. Nach Hemmung der Glukosepermeation mittels Phlorizin dringen noch 0.70 mM Mg^{2+}/l ein. Dies entspricht der Mg^{2+}-Menge, die in die Zellen gelangt, wenn die Temperatur auf 0^{o} C herabgesetzt wurde oder wenn die verschiedenen Stoffwechselfunktionen durch spezifische Inhibitoren gehemmt wurden. Die aufgenommene Mg^{2+}-Menge wurde deshalb

auf passive Diffusion infolge der angewendeten erhöhten extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration zurückgeführt, während der darüber hinausgehende Betrag auf stoffwechselabhängigen Reaktionen beruht.

Die stoffwechselabhängige Mg^{2+}-Aufnahme ist von Phosphorylierungsreaktionen abhängig. Mit steigender extrazellulärer Phosphatkonzentration wird die Mg^{2+}-Aufnahme vergrößert; werden Phosphorylierungsreaktionen durch Arsenat unterbrochen, dann nimmt die Mg^{2+}-Aufnahme ab.

Der stoffwechselabhängige Mg^{2+}-Transport hängt von der ATP-Synthese ab. Bei glykolysierenden menschlichen Erythrozyten wird die Mg^{2+}-Aufnahme nach Unterbrechung der Triosephosphatdehydrogenasereaktion durch Monojodacetat herabgesetzt. Entsprechend ist bei atmenden Hühnererythrozyten infolge der Hemmung der Cytochrom-c-Oxydase-Reaktion durch Cyanid die Mg^{2+}-Aufnahme ebenfalls auf die Hälfte reduziert. Bei Ascites-Tumorzellen nimmt der Mg^{2+}-Transport in Gegenwart von NaF und Cyanid ab. Die ATP-Abhängigkeit des Mg^{2+}-Transportes wird dadurch bewiesen, daß mit der Hemmung der Atmungskettenphosphorylierung des ADP mit den Entkopplern DNP und Azid die aktive Mg^{2+}-Aufnahme von Hühnererythrozyten und Ascites-Zellen aufgehoben ist.

Die Mg^{2+}-Aufnahme hängt außerdem von der extrazellulären Konzentration anderer Kationen ab. K^+ fördert bis zu einer Konzentration von 7.5 mM/l die Mg^{2+}-Aufnahme und hemmt in höheren Konzentrationen. Steigende Na^+-Konzentrationen begünstigen die Mg^{2+}-Aufnahme. Die optimale Ca^{2+}-Konzentration liegt bei 3 mM/l.

Die aktive Mg^{2+}-Aufnahme wird etwa durch die Strophanthin-Konzentration gehemmt, die auch den aktiven Na^+-K^+-Transport verhindert.

Zwischen der stoffwechselabhängigen Mg^{2+}-Aufnahme und dem aktiven Na^{+}-K^{+}-Transport herrschen also analoge Verhältnisse. Zur Erklärung der aktiven Mg^{2+}-Aufnahme wurde deshalb der gleiche Mechanismus herangezogen, der für den aktiven Na^{+}-K^{+}-Transport angenommen wird.

Literaturverzeichnis

1 WIDDOWSON,E.M. et al. Clin.Sci. 10, 113 (1951); zitiert nach Wacker,W.E.C. New Engl.J.Med. 259, 475 (1958). Magnesium metabolism

2 HÄNZE,S. Der Magnesiumstoffwechsel, Thieme Verlag Stuttgart 1962

3 SOHL,A.T. Am.Chem.Soc.Monograph No 82. Mineral metabolism; zitiert nach Hasselman,J.J.F., van Kampen, E.J. Clin.Chem.Acta 3, 305 (1958). Magnesium

4 GRISWOLD,R.L., PACE,N. Exp.Cell.Res. 11, 362 (1956). The intracellular distribution of metal ions in rat liver

5 THIERS,R.E., VALLEE,B.L. J.Biol.Chem. 226, 911 (1957). Distribution of metals in subcellar fractions of rat liver

6 RAAFLAUB,J. Helv.Physiol.Acta 14, 304 (1956). Die Metallpufferfunktion der Adenosinphosphate

7 NAORA,H. et al. J.Gen.Physiol. 44, 713 (1956). Magnesium and calcium in isolated nuclei

8 MARTELL,E. SCHWARZENBACH,G. Helv.Chem.Acta 39, 653 (1956). Adenosinphosphate und Triphosphat als Komplexbildner für Calcium und Magnesium

9 NANNINGA,B. J.Phys.Chem. 61, 1144 (1957); zitiert nach 14

10 SMITH,R.M., ALBERTY,R.A. J.Am.Chem.Soc. 78, 2376 (1958); zitiert nach 14

11 WALAAS,E. Acta Chem.Scand. 12, 528 (1958); zitiert nach 14

12 MELCHIOR,N.C., MELCHIOR,J.B. J.Biol.Chem. 231, 609 (1958); zitiert nach 14

13 NANNINGA,B. Biochim.Biophys.Acta 54, 330 (1961). The association constant of the complexes of adenosine triphosphate with magnesium, calcium, strontium and barium ions

14 BURTON,K. Biochem.J. 71, 388 (1959). Formation constants for the complexes of adenosine di- or tri-phosphate with magnesium or calcium ions

15 MARTELL,E. Die komplexometrische Titration. Die chemische Analyse, Band 45. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1955

16 RAAFLAUB,J., LEUPIN,E. Helv.Chem.Acta 39, 832 (1956). Über die Anwendung von Metallpuffern bei Fermentreaktionen. Die p_{Mg}-Aktivitätskurve der Hixokinase aus Hefe

17 JOHNSON,M.J. et al. J.Biol.Chem. 116, 515 (1936). The magnesium activated leucly peptidase of animal erepsin

18 BERGER,J., JOHNSON,M.J. J.Biol.Chem. 130, 641 (1939). Metal activation of peptidases

19 SCHWIMMER,S. J.Biol.Chem. 154, 361 (1944). Comparision of crude and purified preparation of a leucyl-peptidase associated with beef muscle

20 SMITH,E.L. J.Biol.Chem. 163, 15 (1946). Manganese and L-Leucin-Aminopeptidase

21 SMITH,E.L. J.Biol.Chem. 173, 571 (1948). The glycylglycine dipeptidase of skeletal muscle and human uterus

22 SMITH,E., SPACKMAN,D.H. J.Biol.Chem. 212, 271 (1955). Leucin aminopeptidase. 5.Activation, specifity, and mechanism of action

23 SMITH,E.L., HANSON,H.T. J.Biol.Chem. 176, 997 (1948). Pancreatic carboxypeptidase: a metal protein

24 SMITH,E.L., HANSON,H.T. J.Biol.Chem. 179, 803 (1949). The chemicyl nature and mode of action of pancreatic carboxypeptidase

25 SMITH,E. J.Biol.Chem. 175, 39 (1948). Action of carboxypeptidase on peptide derivate of L-tryptophan

26 GREEN,D.E. et al. J.Biol.Chem. 138, 327 (1940). Carboxylase

27 GREEN,D.E. J.Biol.Chem. 145, 69 (1942). Carboxylase of animal tissues

28 OHLMEYER,P. Z.physiol.Chem. 282, 1 (1945). Über Phosphatase

29 BAILEY,K., WEBB,E.C. Biochem.J. 38, 394 (1944). Purification and properties of yeast pyrophosphatase

30 NEUMANN,H. Biochim.Biophys.Acta 3, 117 (1949). Dependence of the pH-optimum of the phosphomonoesterase 1 on substrate concentration

31 KLEMPERER,F.W. et al. J.Biol.Chem. 180, 281 (1949). The inhibition of alkaline phosphatase by beryllium

32 GRIER,R.S. et al. J.Biol.Chem. 180, 289 (1949). Observations on the effects of beryllium on alkaline phosphatase

33 CORI,G.T. et al. J.Biol.Chem. 124, 543 (1938). The enzymatic conversion of glucose-1-phosphoric ester to 6-ester in tissue extracts

34 NAJJAR,V.A. J.Biol.Chem. 175, 281 (1948). The isolation and properties of phosphoglucomutase

35 STICKLAND,L.H. Biochem.J. 44, 190 (1949). The activation of phosphoglucomutase

36 COLOWICK,S.P. J.Biol.Chem. 168, 583 (1947). The effect of adrenal cortex and the anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinase reaction

37 HERS,H.G. Biochim.Biophys.Acta 8, 416 (1952). La fructokinase du foie

38 HERS,H.G. Biochim.Biophys.Acta 8, 424 (1952). Rôle du magnesium et du potassium dans la réaction fructokinasique

39 BOYER,P. at al. J.Biol.Chem. 149, 529 (1943). Further studies on the rôle of potassium and other ions in the phosphorylation of the adenylic system

40 KALCKAR,H.M. J.Biol.Chem. 148, 127 (1943). The rôle of myokinase in transphosphorylation. 2. The enzymatic reaction of myokinase on adenine nucleotides

41 KIELLEY,W.W., MEYERHOF,O. J.Biol.Chem. 176, 591 (1948). Studies on adenosintriphosphatase of muscle. 2. A new magnesium activated adenosintriphosphatase

42 KIELLEY,W.W., KIELLEY,R.W. J.Biol.Chem. 200, 213 (1953). A specific adenosintriphosphatase of liver mitochondria

43 KUBY,S.A. et al. J.Biol.Chem. 210, 65 (1954). Adenosintriphosphatase-creatine transphosphorylase. 3. Kinetic studies

44 NODA,L. et al. J.Biol.Chem. 235, 2830 (1960). The enzymatic activity and inhibition of adenosine-5-triphosphate creatine transphosphorylase

45 MORRISON,J.F. Biochem.J. 65, 143 (1957). The purification and properties of arginin phosphokinase

46 MORRISON,J.F. Biochem.J. 65, 153 (1957). A study of the kineticy of the reaction catalysed by arginin phosphokinase

47 MARTELL,A.E. The chemistry of the metal chelat compounds, p. 401, Prentice Hall, Inc. New York 1956

48 BARRON,E. KALNITSKY,G. Biochem.J. 41, 346 (1947). The inhibition of succinoxydase by heavy metals and its reactivation with dithiols

49 LEHMAN,J.R., NASON,A.J. J.Biol.Chem. 222, 497 (1956). The role of lipides in electron transport. 1.Properties of a diphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase from skeletal muscle

50 BRINTZINGER,H., FALLAB,S. Helv.Chem.Acta 43, 43 (1960). Zur Metallspezifität ATP-abhängiger Enzyme. Eine komplexchemische Deutung, belegt am Beispiel der Hexokinase

51 LARSSON-RÅZNIKIEWICZ,M., MALMSTRÖM,B.G. Arch.Biochem. Biophys. 92, 94 (1961). The metal ion activation of 3-phosphoglycerate kinase in correlation with metal-binding studies

52 TAPLEY,D.F. Biochim.Biophys.Acta 18, 597 (1955). The action of thyroxine on mitochondria and oxydative phosphorylation

53 TAPLEY,D.F. J.Biol.Chem. 222, 325 (1956). The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria

54 LEHNINGER,A.L. J.Biol.Chem. 234, 2465 (1959). Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosintriphosphate

55 BALTSCHEFFSKY,H. Biochim.Biophys.Acta 20, 434 (1956). Mitochondrial oxydative phosphorylation in a magnesium free medium

56 Mc CARTHY,B.J. Biochim.Biophys.Acta 55, 880 (1962). The effects of magnesium starvation on the ribosome content of Escherichia coli

57 TUFTS,E.V., GREENBERG,D.M. J.Biol.Chem. 122, 693 (1937-38). The biochemistry of magnesium deficiency 1. Chemical changes resulting from magnesium deprivation

58 ROGERS,T.A., MAHAN,P.E. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100, 235 (1959). Exchanges of radioactive magnesium in the rat

59 ROGERS,T.A. J.Cell.Comp.Physiol. 57, 119 (1961). The exchange of radioactive magnesium in erythrocytes of several species

60 NANNINGA,L.B. Biochim.Biophys.Acta 54, 338 (1961). Calculation of free magnesium, calcium and potassium in muscle

61 CONWAY,E.J., HINGERTY,D. Biochem.J. 40, 561 (1946). The influence of adrenalectomie on muscle constitutents

62 COPE,C.L., WOLFF,B. Biochem.J. 36, 413 (1942). The ultrafiltrabel serum magnesium in hyperthyroidism

63 GREENE,D.H., POWER,H.H. J.Biol.Chem. 91, 183 (1931). The distribution of electrolytes between serum and in vivo dialysate

64 GILBERT,D.L. J.Gen.Physiol. 43, 1103 (1960). Magnesium equilibrium in muscle

65 ROSENBERG,Th. The concept and definition of active transport in Active Transport and Secretion, Cambridge University Press, 1954

66 KORGH,A. Proc.Roy.Soc. (Lond) B 133, 140 (1946), nach Mudge,G.H. p. 77 in Ion transport across membranes, ed. H.T.Clarke, Academic Press, New York 1954

67 WARBURG,O. Biochem.Z. 142, 317 (1923). Versuche an überlebendem Carcinomgewebe

68 AEBI,H. Helv.Physiol.Acta 8, 525 (1950). Kationenmilieu und Gewebsatmung

69 KALANT,H., YOUNG,F.R.S. Nature 179, 816 (1957). Metabolic behaviour of isolated liver and kidney cells

70 LEESON,T.S., KALANT,H. J.Biophys.Biochem.Cytol. 10, 95 (1961). Effects of in vitro decalcification on ultrastructure of adult rat liver

71 LAWS,J.O., STICKLAND,L.H. Nature 178, 309 (1956). Metabolism of isolated liver cells

72 LAWS,J.O., STICKLAND,L.H. The adhesion of liver cells, Expl.Cell.Res. 24, 240 (1961)

73 ZIMMERMAN,M. et al. Nature 185, 315 (1960). Anaerobic glycolysis of dispersed cell suspensions from normal and malignant tissues

74 KALANT,H. et al. im Druck, zitiert nach 70

75 LONGMUIR,J.S., REES,W.A. Nature 177, 997 (1956). Preparation of cell suspensions from rat livers

76 AIKAWA,J.K. et al. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 98, 29 (1958). Urinary and fecal excretion of orally administered Mg^{28}

77 AIKAWA,J.K. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100, 293 (1959). Gastrointestinal absorption of Mg^{28} in rabbits

78 CONWAY,E.J., BEARY,M.E. Biochem.J. 69, 275 (1958). Active transport of magnesium across the yeast cell membrane

79 HARRIS,J.E. J.Biol.Chem. 141, 579 (1941). The influence of the metabolism of human erythrocytes on their potassium content

80 MAIZELS,M. J.Physiol. 125, 263 (1954). Cation transport in chicken erythrocytes

81 FRAZIER,H.S. et al. J.Gen.Physiol. 37, 631 (1954). Potassium uptake by the dog erythrocyte

82 JOYCE,C.R.B. J.Physiol.141, 90 (1958). Difference between parts of packed human red cell columns

83 PRANKERD,T.A.J. J.Physiol. 143, 325 (1958). The ageing of red cells

84 WHITTAM,R. J.Physiol. 140, 479 (1958). Potassium movements and ATP in human red cells

85 LARIS,Ph.C. J.Cell.Comp. Physiol. 51, 273 (1958). Permeability and utilization of glucose in mammalian erythrocytes

86 ROTHSTEIN,A., HEAYES,A.D. Arch.Biochem.Biophys. 63, 87 (1956). The relationship of the cell surface to metabolism. 12. The cation binding properties of the yeast cell surface

87 ROTHSTEIN,A. et al. J.Gen.Physiol. 41, 585 (1958). The active transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} into the yeast cell

88 WAHLER,B.E. Z.physiol.Chem. 306, 84 (1956). Bestimmungen von 2 - 20 γ Inulin in tierischen Geweben

89 Mc CRUDDEN,F.H. J.Biol.Chem. 7, 83 (1909-10). The quantitative separation of calcium and magnesium in the presence of phosphates and small amounts of iron especially for the analysis of foods, urine and feces

90 Mc KIM MARIOTT,W., HOWLAND,J. J.Biol.Chem. 32, 233 (1917). A micro method for the determination of calcium and magnesium in blood serum

91 GREENBERG,D.M., MACEY,M.A. J.Biol.Chem. 96, 419 (1932). The determination of Mg in blood with 8-hydroxyquinoline

92 ORANGE,M., RHEIN,H.C. J.Biol.Chem. 189, 379 (1951). Microestimation of magnesium in body fluids

93 KOLTHOFF,J.M. Biochem.Z. 185, 344 (1927). Eine neue spezifische Farbreaktion auf Magnesium und eine einfache kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Spuren dieses Elements

94 GARNER,R.J. Biochem.J. 40, 828 (1946). Colorimetric determination of magnesium in plasma or serum by means of titan yellow

95 ROSS,D.B. J.Physiol. 160, 417 (1962). In vitro studies on the transport of magnesium across the intestinal wall of the rat

96 CSÁKY,T.Z., THALE,M. J.Physiol. 151, 59 (1960). Effect of ionic environment on intestinal sugar transport

97 CSÁKY,T.Z., ZOLLICOFFER,L. Am.J.Physiol. 198, 1056 (1960). Ionic effect on intestinal transport of glucose in the rat

98 ROSS,D.B. Nature 189, 840 (1961). Influence of sodium on the transport of magnesium across the intestinal wall of the rat in vitro

99 HARRIS,E.J. Symp.S.oc.Exp.Biol. 8, 228 (1958). Linkage of sodium and potassium active transport in human erythrocytes in: Active Transport and Secretion, Cambridge University Press

100 GLYNN,J.M. J.Physiol. 134, 278 (1956). Sodium and potassium movements in human red cells

101 CLARKSON,E.M., MAIZELS,M. J.Physiol. 129, 476 (1955). Sodium transfer in human and chicken erythrocytes

102 BOLINBROKE,V., MAIZELS,M. J.Physiol. 149, 563 (1959). Calcium ions and the permeability of human erythrocytes

103 GARDOS,G. Biochim.Biophys.Acta 30, 653 (1958). The function of calcium in potassium permeability of human erythrocytes

104 DALTON,J.C. J.Gen.Physiol. 42, 971 (1959). Effects of external ions on membran potential of crayfish giant axon

105 DUMONT,P.A. et al. J.Gen.Physiol. 43, 1119 (1960). Calcium and strontium in rat small intestine. Their fluxes and effect on Na flux

106 RUMMEL,W., STUPP,H.F. Arch.exp.Path.Pharm. 240, 79 (1960). Der Einfluß von Kalium und Calcium auf die Glukose- und Wasserresorption des isolierten Dünndarmes

107 WEED,R.J., ROTHSTEIN,A. J.Gen.Physiol. 44, 301 (1960). The uptake of divalent manganese by mature normal human red blood cells

108 PASSOW,H. Zusammenwirken von Membranstruktur und Zellstoffwechsel bei der Regulierung der Ionenpermeabilität roter Blutkörperchen in: Biochemie des aktiven Transportes, Springer Verlag Berlin 1961

109 BOVARNICK,M.R., SCHNEIDER,L. J.Biol.Chem. 235, 1727 (1960). The incorporation of glycine -1 -C^{14} by typhus Rickettsiae

110 CHRISTENSEN,H.N. et al. J.Biol.Chem. 194, 41 (1952). Concentrative uptake of amino acids by erythrocytes in vitro

111 LIETZE,A. et al. Arch.Biochem.Biophys. 76, 255 (1958). Concentration of glycin in duck erythrocytes

112 CHRISTENSEN,H.N., RIGGS,Th.R. J.Biol.Chem. 194, 57 (1952). Concentration of amino acids by the Ehrlich mouse ascites carcinoma cell

113 CHRISTENSEN,H.N. et al. J.Biol.Chem. 198, 1 (1952). Amino acid concentration by a free cell neoplasm: relation among amino acids

114 CHRISTENSEN,H.N. et al. J.Biol.Chem. 209, 413 (1954). Effect of pyridoxal and indolacetate on cell uptake of amino acids in potassium

115 Le FEVRE,P.G. et al. Symp.Soc.Exp.Biol. 8, 118 (1954). The evidence for active transport of monosaccharides across the red cell membrane in: Active Transport an Secretion, Cambridge, University Press

116 ROSENBERG,Th., WILBRANDT,W. Helv.Physiol.Acta 15, 168 (1957). Strukturabhängigkeit der Hemmwirkung von Phlorrhizin und anderer Phloretinderivate auf den Glukosetransport durch die Erythrozytenmembran

117 LARIS,Ph.C. J.Cell.Comp.Physiol. 55, 127 (1960). Phloretin, phloridzin and glucose inhibition of a phosphatase on the stromata of rabbit erythrocytes

118 CRANE,R.K. et al. J.Biol.Chem. 224, 649 (1957). Studies on tissue permeability. I. The penetration of sugars into Ehrlich ascites tumor cells

119 WILBRANDT,W. Symp.Soc.Exp.Biol. 8, 136 (1954). Secretion and transport of nonelectrolytes in Active Transport and Secretion, Cambridge, University Press

120 KELLER,D.M., LOTSPEICH,W.D. J.Biol.Chem. 234, 991 (1959). Effect of phlorizin on the osmotic behaviour of mitochondria in isotonic sucrose

121 BORST-PAUWELS,G.W.F.H. Naturwissenschaften 19, 454 (1962). The effect of magnesium on the uptake of orthophosphate by Saccharomyces cerevisiae

122 CRANE,R.W., LIPMANN,F.J.Biol.Chem. 201, 235 (1953). The effect of arsenate on aerobic phosphorylation

123 AZZONE,G.F., ERNSTER,L. J.Biol.Chem. 236, 150 (1961) Compartmentation of mitochondrial phosphorylation as disclosed in studies with arsenate

124 WADKINS,Ch.L. J.Biol.Chem. 235, 3300 (1960). Stimulation of adenosin triphosphatase activity of mitochondria and submitochondrial particles by arsenat

125 WARBURG,O., CHRISTIAN,W. Biochem.Z. 303, 40 (1939). Isolierung und Kristallisierung des Proteins des oxydierenden Gärungsfermentes

126 DONDOROFF,M. et al. J.Biol.Chem. 170, 147 (1947). Studies with bacterial sucrose phosphorylase. 3. Arsenolytic decomposition of glucose-1-phosphate

127 NEEDHAM,D.M., PILLAI,R.K. Biochem.J. 31, 1837 (1931). The coupling of oxydo-reduction and dismutation with esterification of phosphate in muscle

128 GREEN,D.E. et al. Biochem.J. 31, 2327 (1937). Dismutations and oxydoreductions

129 HOPKINS,G. et al. Biochem.J. 32, 1829 (1938). The influence of thiol groups in the activity of dehydrogenases

130 RACKER,E,, KRIMSKY,J. J.Biol.Chem. 198, 731 (1952). The mechanism of oxydation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

131 GERLACH,E., LÜBBEN,K. Pflügers Archiv 269, 520 (1959). Der Phosphat-Stoffwechsel in Tauben- und Menschenerythrozyten unter dem Einfluß von 2.4 Dintirophenol, Natriumcyanid, Monojodacetat sowie Thyroxin und Triethylenmelamin

132 LOHMANN,K., MEYERHOF,O. Biochem.Z. 273, 60 (1937). Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure

133 WARBURG,O., CHRISTIAN,W. Biochem.Z. 310, 384 (1941). Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase

134 WILBRANDT,W. Pflügers Archiv 243, 519 (1940). Die Abhängigkeit der Ionenpermeabilität der Erythrozyten vom glykolytischen Stoffwechsel

135 MAIZELS,M. J.Physiol. 112, 59 (1951). Factors in the active transport of cations

136 WARBURG,O. Biochem.Z. 119, 134 (1921). Physikalische Chemie der Zellatmung

137 WARBURG,O. Biochem.Z. 136, 266 (1923). Über die antikatalytische Wirkung von Blausäure

138 DIXON,M., ELLIOTT,K.A.C. Biochem.J. 23, 813 (1929). The effect of cyanide on the respiration

139 NETTER,H., SACHS,L. Biochem.Z. 334, 18 (1961). Stoffwechselabhängige Magnesiumaufnahme bei Bäckerhefe

140 MAIZELS,M. Symp.Soc.Exp.Biol. 8, 202 (1954). Active cation transport in: Active Transport and Secretion, Cambridge, University Press

141 MAIZELS,M. et al. J.Physiol. 140, 80 (1958). Metabolism and sodium transfer of mouse ascites tumor

142 LOOMIS,W.F., LIPMANN,F. J.Biol.Chem. 173, 807 (1948). Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxydation

143 LARDY,H.A., WELLMAN,H. J.Biol.Chem. 201, 357 (1953). The catalytic effect of 2.4 dinitrophenol on adenosintriphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes

144 CHANCE,B., WILLIAMS,S.R. Adv.Enzymol 17, 65 (1956). The respiratory chain and oxydative phosphorylation

145 DRYSDALE,G.R., COHN,M. J.Biol.Chem. 233, 1574 (1958). On the action of 2.4 dinitrophenol in uncoupling oxydative phosphorylation

146 SHACTER,B. Arch.Biochem.Biophys. 57, 387 (1956). Interrelations in respiratory, phosphorylative and mitotic activities of Ehrlich ascites tumor cells: Influence of dinitrophenol

147 WADKINS,Ch.L., LEHNINGER,A.L. J.Biol.Chem. 233, 1589 (1958). The adenosine triphosphate-adenosine diphosphate exchange reaction of oxydative phosphorylation

148 SCHATZMANN,J.J. Helv.Physiol.Acta 11, 346 (1953). Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran

149 JOYCE,C.R.B., WEATHERALL,M. J.Physiol. 127, 330 (1954). Cardiac glycosides and the potassium exchange of human erythrocytes

150 GLYNN,J.M. J.Physiol. 128, 560 (1955). Action of cardiacic glycosides on red cells

151 KAHN,J.B.jr., ACHESON,G.A. J.Pharmacol. 115, 305, (1955). Effects of cardiacic glycosides and other lactones, and of certain other compounds on cation transfer in human erythrocytes

152 MAIZELS,M. et al. J.Physiol. 140, 61 (1958). The effects of certain physical factors and of cardiacic glycosides on sodium transfer by mouse ascites tumor cells

153 SCHREIBER,S. Am.J.Physiol. 185, 337 (1956). Potassium and sodium exchange in working frog heart

154 EDWARDS,C., HARRIS,E.J. J.Physiol. 135, 567 (1957). Factors influencing the sodium movement in frog muscle with a discussion of the mechanism of sodium movement

155 JOHNSON,J.A. Am.J.Physiol. 187, 238 (1956). Influence of ouabain, strophantidin and dihydrosterophantidin on sodium and potassium transport in frog sartorii

156 CALDWELL,P.C., HEYNES,R.D. J.Physiol. 148, 80 (1959). The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon

157 CALDWELL,P.C. J.Physiol. 152, 545 (1960). The phosphorus metabolism of squid axons and its relationship ot the active transport of sodium.

158 WOLLENBERGER,A., WALLER,B. Arch.exp.Path.Pharm. 228, 134 (1956). Einfluß von Protoveratrin und Strophanthin auf den Kationengehalt von Hirnrindenschnitten

159 GARDOS,G.J. Neurochem. 5, 199 (1960). K-accumulation in guinea pig cortex slices

160 SOLOMON,A.K. et al. J.Gen.Physiol. 40, 327 (1956). The kinetic of cardiac glycosides inhibition of potassium transport in human erythrocytes

161 KUNZ,H.A., SULSER,F. Experientia 13, 365 (1957). Über die Hemmung des aktiven Kationentransportes durch Herzglykoside

162 WHITTAM,R. J.Physiol. 140, 479 (1958). Potassium movements and ATP in human red cells

163 HITCHCOCK,D.J. J.Am.chem.Soc. 48, 2870 (1926), zitiert nach 164

164 ASCHHEIM,E. Experientia 16, 305 (1960). Adsorption and active transport

165 JENNINGS,D.H. et al. J.Gen.Physiol. 41, 1019 (1958). The participation of phosphate on the formation of a carrier for the transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} ions into yeast cells

166 GARDOS,G. Acta Physiol.Hung. 10, 185 (1956). The permeability of human erythrocytes to potassium

167 WHITTAM,R. J.Physiol. 137, 130 (1957). Potassium movements and phosphate metabolism in red cells

168 CALDWELL,P.C. et al. J.Physiol. 152, 561 (1960). The effect of injecting "energy-rich" phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of Loligo

169 CALDWELL,P.C. et al. J.Physiol. 152, 591 (1960). Partial inhibitions of the active transport of cations in the giant axons of Loligo

170 POST,R.L. et al. J.Biol.Chem. 235, 1796 (1960). Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte

171 SOLOMON,J.gen.Physiol. 36, 57 (1952), zitiert nach 140

172 DANIELLI,J.F. J.Cell.Comp.Physiol. 5, 495 (1934), zitiert nach Danielli,J.F. Symp.Soc.Exp.Biol. 8, 502 (1954) Morphological and molecular aspects of active transport in: Active Transport and Secretion, Cambridge, University Press

173 SKOU,J.Ch. Biochim.Biophys.Acta 42, 6 (1960). Further investigations on a Mg^{2+} and Na^{+}-activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane

174 SKOU,J.Ch. Biochim.Biophys.Acta 58, 314 (1962). Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^{+} and K^{+}

175 DUNHAM,E.T., GLYNN,D.M. J.Physiol. 156, 274 (1961). Adenosintriphosphatase activity and the active movements of alcali metal ions

Lebenslauf

Ich wurde am 29. 8. 1938 in Berlin geboren und verbrachte hier die Kriegszeit. Im Sommer 1945 wurde ich eingeschult und bestand im Frühjahr 1958 das Abitur auf einer Oberschule wissenschaftlichen Zweiges.

Im April 1958 wurde ich zum Studium an der Freien Universität Berlin zugelassen und bestand nach zwei Semestern das Vorphysikum mit "gut". Im Oktober 1960 folgte das Physikum mit der Note "sehr gut". Anschließend wurde ich von der Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

Das klinische Studium wurde ohne Universitätswechsel in Berlin fortgesetzt und durch das mit "gut" bestandene Staatsexamen am 31. 3. 1964 abgeschlossen.

Seit dem 1. klinischen Semester war ich im Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin als Doktorand beschäftigt. Von Mai bis Oktober 1964 war ich als Medizinalassistent erneut in dem Institut tätig.